



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## VYUŽITÍ MOBILNÍHO TELEFONU K ANALÝZE TEKUTÝCH VZORKŮ

USE OF CELL PHONE IN LIQUIDS ANALYSIS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Křístek

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmíel

BRNO 2016

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Student:** Bc. Tomáš Křístek

**ID:** 147521

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2015/16

**NÁZEV TÉMATU:**

## Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků

### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti využití mobilního telefonu v biomedicině v metodách s optickou analýzou tekutých vzorků. Zaměřte se na přehled konstrukčních řešení s využitím 3D tisku a na varianty používaných elektrooptických prvků. 2) Zaměřte se na metodu ELISA s využitím mobilního telefonu. 3) Návrh metody doplňte o technické řešení se začleněním mobilního telefonu a ostatních potřebných prvků. Návrh musí obsahovat postup měření a hodnocení dat spolu s vizualizací výsledků na displeji telefonu. 4) Vytvořte 3D model konstrukce navrženého zařízení, model vytiskněte na 3D tiskárně a optimalizujte. 5) Realizujte navrženou metodu. Připravte sadu vzorků, které následně využijte pro ověření metody a funkčnosti sestaveného zařízení. 6) Proveďte zhodnocení výsledků. Proveďte diskusi nad možnostmi minimalizace počtu externích prvků spolupracujících s telefonem.

### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] COMINA G., SUSKA A. a D. FILIPPINI. Autonomous Chemical Sensing Interface for Universal Cell Phone Readout. Angew Chem Int Ed Engl, 2015.

[2] COSKUN A., NAGI R., SADEGHI K., PHILLIPS S a A. OZCAN. Albumin testing in urine using a smart-phone. Lab on Chip, 2013.

**Termín zadání:** 8.2.2016

**Termín odevzdání:** 20.5.2016

**Vedoucí práce:** Ing. Vratislav Čmíel

**Konzultant diplomové práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D., předseda oborové rady**

### UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Technologický rozvoj, všeobecná dostupnost a rozšířenost mobilních telefonů umožnily v nedávných letech podniknout řadu kroků, vedoucích k začlenění mobilních telefonů do analytických metod biomedicíny, rozvoji telemedicíny a k boomu osobních zdravotních mobilních aplikací. Tato práce se zabývá literární rešerší využití mobilních telefonů v biomedicině, s důrazem na metody optické analýzy a řešení využívající technologie 3D tisku. Vypracovává návrh a realizuje praktické řešení systému pro měření hladiny kortizolu ve slinách s využitím mobilního telefonu, analytické metody ELISA, technologie 3D tisku a souboru funkcí pro programové prostředí Matlab ve spojení s aplikací Matlab Mobile a MathWorks Cloud. Dále poskytuje kritické zhodnocení výsledků a možností metody, a předkládá soubor návrhů a poznatků pro optimalizaci z hlediska kvality měření.

## **Abstract**

Technological development, broad availability and ubiquity of mobile phones made it possible in recent years to start a progression leading to the integration of mobile phones into biomedical analytical methods, the development of telemedicine and mobile personal health applications. This paper deals with the literature review of the mobile phone usage in biomedicine, with emphasis on the methods of optical analysis and technical solutions using 3D printing technology. It provides a draft and practical implementation of salivary cortisol level measuring system using a mobile phone, ELISA analytical methods, 3D printing technology and a set of custom Matlab functions connected with Matlab Mobile application and Mathworks Cloud. Also provides critical evaluation of results and method possibilities, and presents set of proposals and findings for quality of measurement optimization.

## **Klíčová slova**

Mobilní telefon, biomedicína, 3D tisk, Matlab Mobile, kortizol, ELISA

## **Keywords**

Cell phone, biomedicine, 3D printing, Matlab Mobile, cortisol, ELISA

## **Bibliografická citace**

KŘÍSTEK, Tomáš. *Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 66 s. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

## Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi za poskytnutou pedagogickou a odbornou pomoc, a také za prokázanou trpělivost při konzultacích.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Využití mobilních telefonů v biomedicínských aplikacích s optickou analýzou .....	9
2.1	Kolorimetrie – testovací proužky .....	9
2.2	Spektrofotometrie/Fotometrie .....	13
2.3	Fluorescence a Fluorimetrie .....	17
2.4	ELISA .....	20
2.5	Mikroskopie .....	23
2.6	Mikrofluidní čipy .....	24
2.7	Využití mikroprocesorově řízeného modulu .....	25
2.8	Obecné problémy a nevýhody .....	25
3	Návrh realizace řešení pro měření hladiny kortizolu pomocí mobilního telefonu .....	27
3.1	Kortizol .....	27
3.2	Princip řešení .....	28
3.3	Varianta konstrukce A .....	29
3.4	Varianta konstrukce B .....	30
4	Praktická realizace analytického systému .....	31
4.1	Hardware .....	31
4.1.1	Mobilní telefony .....	31
4.1.2	Pouzdro .....	32
4.1.3	Napájení .....	37
4.1.4	Difuzor .....	38
4.1.5	Mikrotitrační destička .....	40
4.2	Software .....	41
4.2.1	Matlab .....	41
4.2.2	Matlab mobile .....	41
4.2.3	Google Drive a Dropbox .....	43
4.2.4	Vývoj vlastních řešení .....	43
4.3	Postup práce s analytickým systémem .....	48
4.4	Realizovaný vývoj .....	49
4.5	Ověření funkčnosti .....	55
4.6	Diskuze výsledků .....	58
4.7	Návrhy na vylepšení .....	60
5	Závěr .....	63

# 1 Úvod

Mobilní telefony dnes krom komunikace běžně suplují funkce jiných zařízení, která se kdysi vyskytovala pouze jako samostatné přístroje, ať se již jedná o fotoaparáty či kamery, GPS navigace, hudební přehrávače apod. Moderní telefony obvykle disponují značným výpočetním výkonem, kvalitním senzorovým vybavením (pro účely biomedicíny jsou myšleny především obrazové senzory), a se znalostí prostředí operačních systémů a programovacích jazyků pro ně lze vytvořit nepřeberné množství různých aplikací.

Ve světle narůstajících technologických možností a nových trendů bylo jen otázkou času, než se objeví první pokusy nahradit malé jednoúčelové analyzátoři, a poté i dražší a větší laboratorní přístroje, mobilními telefony. Dnes již lze ve světě nalézt poměrně široké zastoupení malých jednoduchých analyzátorů připojitelných k telefonu, sloužících především k osobním potřebám. Často se jedná o osobní glukometry. Pozvolna se však objevují i mobilní systémy, které nahrazují větší laboratorní přístroje, jako jsou spektrofotometry, mikroskopy, nebo čtečky mikrotitračních destiček.

Se zjednodušováním a zmenšováním měřících přístrojů souvisí, mimo jiné, tzv. point-of-care testování (POCT), a lab-on-chip (LOC). POTC, tedy měření přímo v místě péče o pacienta, využívá především jednoduchých, někdy jednorázových analyzátorů (jako příklad lze uvést měření hladiny CRP z kapky krve přímo v ordinaci praktického lékaře, nebo jednorázový set pro diagnostiku syfilis). Výsledky jsou však známy prakticky okamžitě, přímo na místě. Přístup LOC spočívá v koncentraci analytické metody do rozměrově malého, levného a jednoduchého čipu. Oba tyto přístupy se mohou využitím mobilních telefonů výhodně podporovat.

Některé projekty s úspěchem využívají pro své systémy technologie 3D tisku. Právě 3D tisk, umožňující po vrstvách vytvořit objekt prakticky jakéhokoli tvaru, přímo na pracovišti, a v relativně krátkém čase, výrazně zjednodušuje a zlevňuje tvorbu jednotlivých komponent, a tím i celých systémů.

Tato práce se zaměřuje především na využití mobilních telefonů v optické analýze tekutých vzorků, a to jak pro osobní použití, tak jako levnější a jednodušší náhrady za klasické laboratorní přístroje. Je vhodné však pamatovat na to, že mobilní telefony se v biomedicině neomezují jen na optickou analýzu, ale jejich využití, jak potenciální, tak praxí prověřené, je mnohem širší. Za zmínku stojí například rychle rozvíjející se telemedicina, nebo různé adaptace menších monitorovacích a diagnostických přístrojů (EKG, tlak krve, ale i přístroje pro oftalmologická měření, či ultrazvukové sondy) pro mobilní telefony. Trendem posledních let jsou tzv. zdravotní aplikace (health apps), které dávají uživateli informace o jeho zdravotním či fyzickém stavu. Často pracují v kombinaci s přídatným zařízením (wearables - senzory, hodinky), a jsou dostupné široké veřejnosti.

Tato práce si klade za cíl sestavit literární rešerši ohledně inovativních řešení relevantních k zadanému tématu, vypracovat jeden nebo více teoretických návrhů analytické metody pro měření ELISA, realizovat jednu vybranou metodu, v praxi vyzkoušet, zhodnotit a případně optimalizovat nebo poskytnout návrhy pro další vylepšení.

Pro účely této práce se mobilním telefonem dále rozumí tzv. chytrý mobilní telefon (smartphone), obvykle vybaven vlastní kamerou/fotoaparátem, případně i vlastním přisvětlovacím prvkem (např. LED), a schopností připojení k Wi-Fi a/nebo k mobilním datovým sítím.



## **2 Využití mobilních telefonů v biomedicínských aplikacích s optickou analýzou**

Tato kapitola se zabývá řešením v oblasti využití mobilních telefonů pro aplikace a metody využívající různé formy optické analýzy, s důrazem na řešení s využitím 3D tisku. V každé kapitole je zařazen stručný úvod a dále popis konkrétních realizací. V poslední podkapitole jsou rozebrány některé problémy a nevýhody vyplývající z použití mobilních telefonů pro biomedicínské účely.

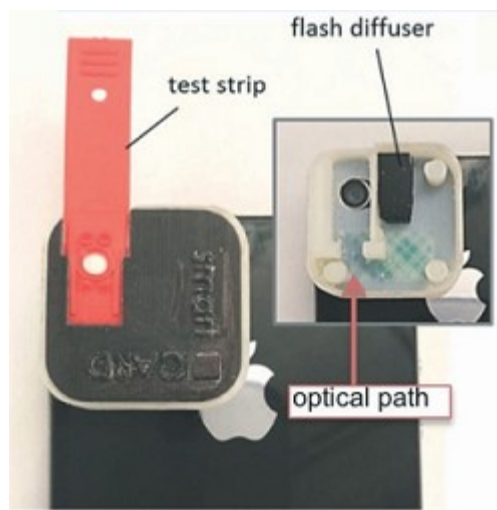
### **2.1 Kolorimetrie – testovací proužky**

Kolorimetrie v chemii označuje metodu, založenou na porovnávání obarveného vzorku s neznámou koncentrací dané látky vůči referenčním (kalibračním) vzorkům téže látky o známých koncentracích. Základem je reakce zkoumané látky (případně jiné látky, jejíž koncentrace je na koncentraci analyzované látky závislá), se specifickým barvicím činidlem [1][14].

Vnímání atributů zbarvení jak lidským okem, tak přístroji, je silně ovlivněno světlem dopadajícím na vzorek a tím, jak se od něj odráží. Aby byla měření opakovatelná, je nutné zajistit co možná nejjednodušší podmínky osvětlení vzorku. Ideálně je vhodné se zbavit vlivu okolního osvětlení, které je náročné, či přímo nemožné regulovat. Toho lze dosáhnout jednoduše uzavřením snímací soustavy se vzorkem do neprůhledného obalu. Pak je ovšem nutné zajistit umělé osvětlení, které však lze zpravidla dobře regulovat. Pakliže je prováděno měření na vzorku za proměnného osvětlení (ambientní světlo, vzájemně se lišící umělé zdroje), je nutné kalibrovat měření pro dané světelné podmínky, nebo korigovat naměřené výsledky. Některé aplikace provádějí korigující měření pro zvýšení přesnosti i při použití jediného, stabilního světelného zdroje [1][20].

Pro kolorimetrická měření pomocí telefonů bývá nezdědka využíván převod z RGB do HSL prostoru, neboť lépe odpovídá barevným atributům, jejichž změny vzorek prodělá (odstín, sytost, světlost/jas) [2][1][20].

Častým řešením, se kterým se lze v oblasti optoanalýzy mobilním telefonem setkat, je využití biochemických testovacích proužků. Tyto proužky při kontaktu se zkoumaným analytem mění některou svou barevnou charakteristiku (odstín, světlost) v závislosti na přítomnosti a/nebo množství hledané látky, nebo na hodnotě zkoumaného parametru. Příkladem mohou být proužky pro měření hladiny glukózy či cholesterolu, nebo pH proužky. Díky využití kamery mobilního telefonu a algoritmů pro analýzu obrazu je pak možné měřit nejen kvalitativní parametry, ale i relativně jemné kvantitativní změny [2][3][1][20].



**Obrázek 1: Pouzdro pro snímání testovacích proužků. Zdroj [1]**

Jednoduchou a relativně robustní konstrukční metodou je použití malého, vzhledem k okolnímu světlu uzavřeného systému, který lze nasadit na kryt mobilního telefonu, do oblasti fotoaparátu a přisvětlovací diody (případně xenonového blesku). Toto řešení demonstrují např. práce [3][1][20]. Testovací proužek s naneseným analytem se vkládá do tohoto systému, před kameru telefonu. Součástí systému mohou být vhodně zvolené optické čočky, které řeší problém příliš nízké vzdálenosti snímaného proužku od kamery (obvykle v řádech mm či cm, zatímco zaostřovací vzdálenosti telefonních kamer se pohybuje v řádech jednotek až desítek cm). Po umístění proužku mobilní telefon s použitím vlastního světelného zdroje a kamery pořídí snímek (lze však uvažovat i nad souvislou analýzou v průběhu času nahráváním videa, pokud je předmět zájmu vývoj vzorku v čase). Následně lze pomocí analýzy výsledného snímku a kalibrační křivky uplatnit kolorimetrické metody a provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Součástí těchto řešení je obvykle i mobilní aplikace, nainstalovaná na dotyčném telefonu, která řídí snímání, provádí samotnou analýzu a prezentuje výsledky [3][1][20]. Dále pak může obsahovat i jiné přídatné funkce, dle libosti autorů, např. odesílání výsledků do e-mailové schránky.

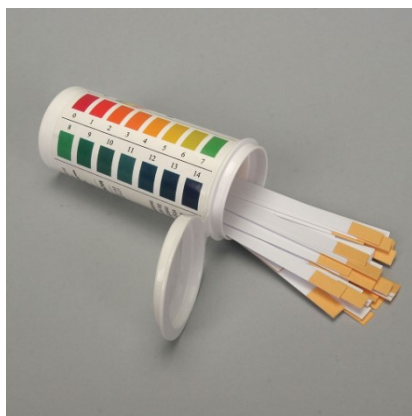


**Obrázek 2: Grafické rozhraní aplikace pro měření cholesterolu. Zdroj: [1]**

Velkou výhodou tohoto řešení je zbavení se nutnosti řešit proměnlivé podmínky osvětlení vlivem okolního světla. Jediným zdrojem světla, který bude při snímání na proužek působit je vlastní světelný zdroj telefonu. Pro zajištění co nejvyšší homogenity osvětlení cílové oblasti testovacího proužku využívají někteří autoři difuzér, umístěný před světelný zdroj telefonu [3][1].

Obecně lze říci, že tento způsob řešení přináší velké výhody zejména, co se samotného snímání týká. Krom odstínění okolního světla a opakovatelnosti podmínek daných světelným zdrojem telefonu, se jedná také o stabilní a jednotnou vzdálenost objektu od senzoru, nezávislost na jemných pohybech přístroje při držení v ruce (třes či houpavé pohyby rukou). Celkově se pak jedná o levné, na výrobu nenáročné, a vzhledem k uvedenému spolehlivé řešení. Samotné pouzdro bývá vyrobeno pomocí 3D tisku. Někteří autoři uvádějí schopnost dosáhnout kvality výsledků srovnatelné s většími laboratorními přístroji, nebo alespoň úroveň běžně potřebné v praxi (mimo medicínské určení) [3][1][20].

Na straně nevýhod pak vystupují především rozdíly v prostorových a osvětlovacích podmínkách, které vytvářejí samotné telefony. Různé modely disponují nejen rozdílnými kamerami s rozdílnými vlastnostmi a různými světelnými zdroji, ale také odlišným prostorovým uspořádáním jednotlivých prvků na těle telefonu. Zda je systém kompatibilní s různými telefony, nebo je závislý pouze na jediném modelu, pak záleží na konkrétním provedení. Obecně rozdíly mezi různými modely telefonu přinášejí jak komplikace konstrukční, tak analytické. Pro každý odlišný model je nutno provést kalibraci, pokud testovací proužek sám nenese autokalibrační prvky. Telefony bez přisvětlovacího zdroje nelze pro tato řešení vůbec použít. Zajímavým a zjevně ne zcela prozkoumaným elementem může být také možnost kontaminace mezi proužky při vkládání do těla systému, pokud tento není používán jednorázově.



**Obrázek 3: Ilustrační příklad testovacích proužků (Hydrion Spectral pH Strips)**

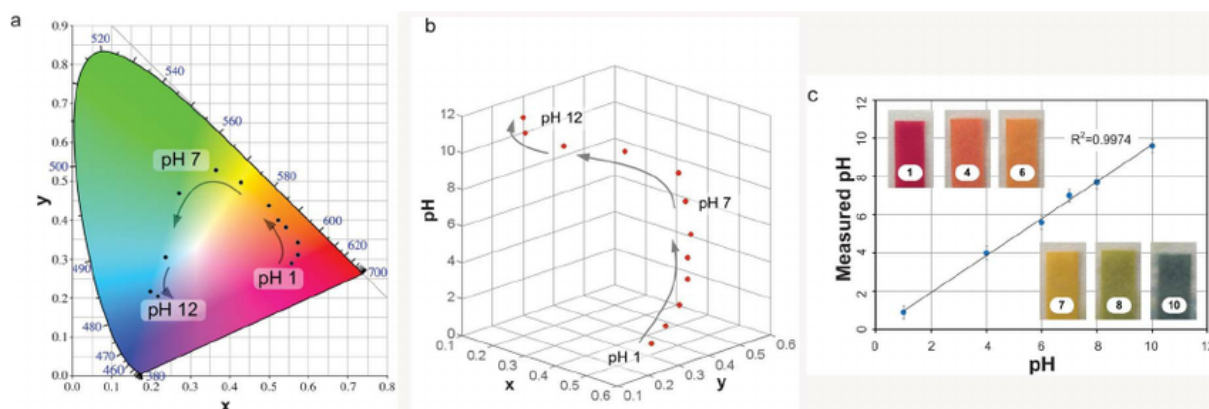
Jiným přístupem pro kolorimetrické měření testovacích proužků je fotografování proužků bez zásahů do způsobů a podmínek osvětlení. Snímání se tedy provádí jak při ambientním světle, tak při osvětlení např. bleskem telefonu.



**Obrázek 4: Kolorimetrie s využitím referenčních hodnot. Zdroj: [2]**

Takovýmto řešením se zabývá například práce [2]. Jedná se sice o optickou analýzu, nevyužívá však žádných doplňkových optických či elektronických prvků, ani 3D tisku. Nicméně autoři se zajímavým způsobem vyrovnávají s rozdíly v osvětlení při snímání.

Práce demonstruje řešení, které je na způsobu osvětlení nezávislé. Při snímání v proměnlivých světlených podmínkách do procesu zasahují automatické funkce telefonu, např. automatické vyvážení bílé [2]. Autoři vytvořili referenční diagram s několika barvami a odstíny šedi o známých intenzitách. Zachycením tohoto diagramu v zorném poli fotoaparátu jsou kompenzovány automatické zásahy telefonu do snímání. Protože při snímání intenzit v RGB nevykazuje škála pH žádný rozumný trend [2], převádí se snímek z RGB prostoru do CIE 1931. Zde již vykazuje změna pH zřetelný trend a lze sestavit kalibrační křivku, v závislosti na souřadnicích chromaticity  $x$  a  $y$ .



Obrázek 5: pH standardů v CIE 1931 v 2D (a) a 3D (b). Srovnání naměřených a skutečných pH (c). Zdroj: [2]

Autoři prokázali, že hodnoty intenzit naměřené za rozdílných světelných podmínek mají mezi sebou lineární vztah [2]. Tento vztah lze odhadnout na základě porovnání intenzit referenčního diagramu při kalibračním měření a měření za jiných světelných podmínek.

Tento přístup je závislý na modelu telefonu, a proto je potřeba každý použití model recalibrovat. Stačí tak však učinit pouze při inicializačním nastavení. Jedním ze zdrojů nepřesností jsou materiálové rozdíly mezi testovacím proužkem a referenčním diagramem, které způsobují rozdíl v odrazech světla. Autoři odhadují, že vytištěním referenčního diagramu na stejný materiál, jako je testovací proužek, dojde k eliminaci tohoto problému [2]. Použití metody předpokládá homogenní osvětlení snímané oblasti, proto uživatel musí věnovat pozornost správnému umístění telefonu, aby například nezastínil část snímané plochy.

## 2.2 Spektrofotometrie/Fotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda stanovující vlastnosti vzorku na základě absorpce procházejícího světla různých vlnových délek. Metody pracující s jednou, případně několika konkrétními vlnovými délkami, nazýváme fotometrie, pokud pracujeme s rozsahem vlnových délek, hovoříme o spektrofotometrii. Obvyklou aplikací je stanovování koncentrace určité látky ve vzorku, vycházející z Lambert-Beerova zákona, který udává závislost absorbance vzorku při určité vlnové délce procházejícího světla, na koncentraci zkoumané látky [21]:

$$A = c \cdot l \cdot e$$

kde  $A$  je absorbance,  $c$  je koncentrace zkoumané látky,  $l$  je délka kyvety, a  $e$  je molární absorpční koeficient [21].

Principem funkce je prozařování vzorku monochromatickým světlem, obvykle z UV či VIS části spektra (méně často IR), a měření intenzity prošlého světla dopadajícího na

detektor. Molekuly ve vzorku absorbují část procházejícího záření a snižují tak intenzitu prošlého světla. Při znalosti intenzity vyzařovaného světla lze zjistit transmitanci, dle vztahu:

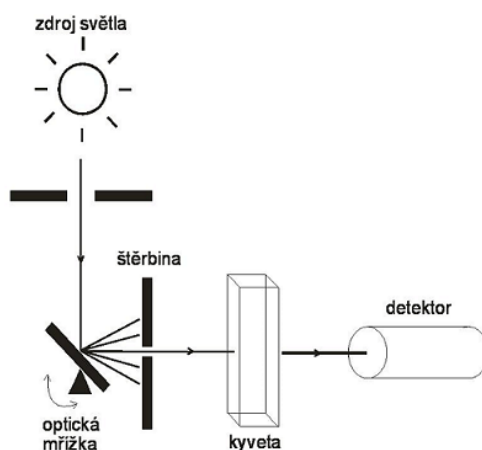
$$T = \frac{I}{I_0}$$

kde  $T$  je transmitance,  $I$  je detekovaná intenzita prošlého světla, a  $I_0$  je intenzita vyzařovaného světla. Z transmitance snadno získáme absorbanci dle vztahu:

$$A = -\log T$$

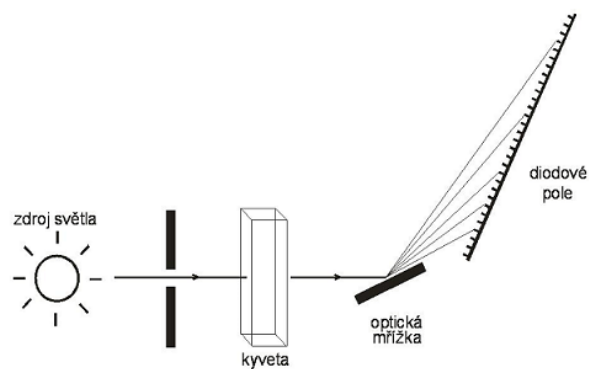
kde  $A$  je absorbance, a  $T$  je transmitance [21].

Hlavními částmi obvyklého spektrofotometru jsou: zdroj světla, monochromátor, část se vzorkem, a detektor. Dále bývají obsaženy čočky a štěrby [21].



Obrázek 6: Jednoduché schéma klasického spektrofotometru

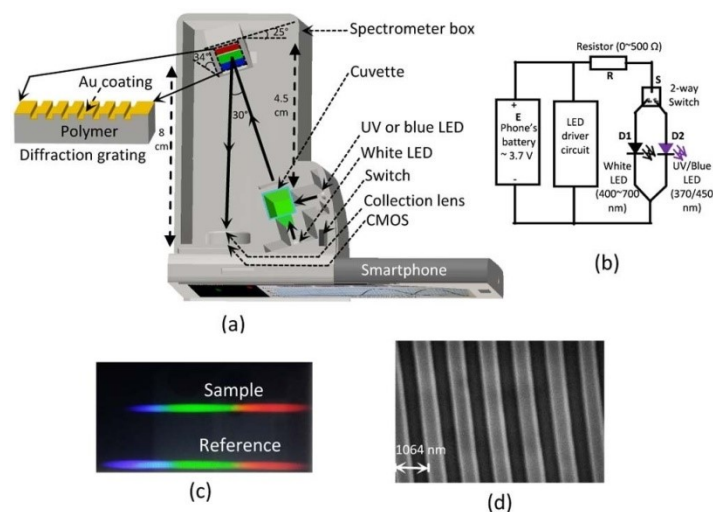
Právě monochromátor je, nejen z hlediska použití mobilního telefonu, pro spektrofotometrii/fotometrii nejkritičtější součástí. V klasickém spektrofotometru bývá monochromátor obvykle realizován pomocí optické mřížky a štěrby. Nakláněním optické mřížky se určuje pracovní vlnová délka světla, které prochází štěrbinou ke vzorku. Šířka štěrby pak určuje specifitu vybrané vlnové délky (čím užší štěrbina, tím užší/přesnější je rozsah prošlých vlnových délek, způsobuje však také vyšší útlum intenzity světla) [21].



**Obrázek 7: Jednoduché schéma spektrofotometru s diodovým polem**

Technicky vyspělejší variantou spektrofotometru je řešení s polem detektorů.

V tomto případě prochází vzorkem světlo přímo ze zdroje. Teprve až prošle světlo se rozkládá na jednotlivé vlnové délky pomocí statické optické mřížky a jednotlivé úzké svazky pak dopadají na jednotlivé detektory v poli (fotodiodové pole nebo CCD/CMOS). Takto lze změřit celé spektrum najednou. Absence pohyblivých částí zlepšuje opakovatelnost měření a činí přístroj robustnějším a konstrukčně jednodušším. Právě tato vlastnost může být pro využití mobilního telefonu pozitivem. Mezi dalšími metodami lze ještě zmínit spektrofotometrii pomocí svislého paprsku a reflexní fotometrii [21].



**Obrázek 8: Spektrofotometr založený na mobilním telefonu: a) schéma celého systému b) schéma zapojení c) porovnání snímků vzorku a standardu d) detail optické mřížky na snímku z elektronového mikroskopu. Zdroj: [9]**

Sestavení spektrofotometru s polem detektorů se věnují například autoři práce [9]. Pomocí 3D tisku je vytvořeno pouzdro spektrofotometru, ke kterému se telefon připojuje. Zdrojem světla je bílá LED telefonu (400-700 nm), a UV nebo modrá LED (370 nebo 450 nm), integrovaná v pouzdře spektrofotometru. Mezi světelnými zdroji lze přepínat. Světlo ze zdroje prochází kyvetou a dopadá na optickou mřížku. Tato mřížka, rozkládající bílé světlo na složky, je vyrobena z polymeru technologií nanoimprintingu a její aktivní povrch je pokryt tenkou vrstvou zlata. Světlo po odrazu a rozložení putuje přes cylindrickou čočku, která jej vhodně koncentruje do úzkého pásu, a dopadá na obrazový senzor telefonu (zde konkrétně CMOS). Použití cylindrické čočky zvyšuje SNR, díky zvýšení intenzity na menší ploše. Vyhodnocení obrazu provádí speciální aplikace pro Android. Pro samotné měření intenzit prošlého světla nejsou využity přímo hodnoty RGB, ale aplikace je převede do HSV prostoru, neboť RGB není monotónní vzhledem k vlnovým délkám a intenzitě [9].

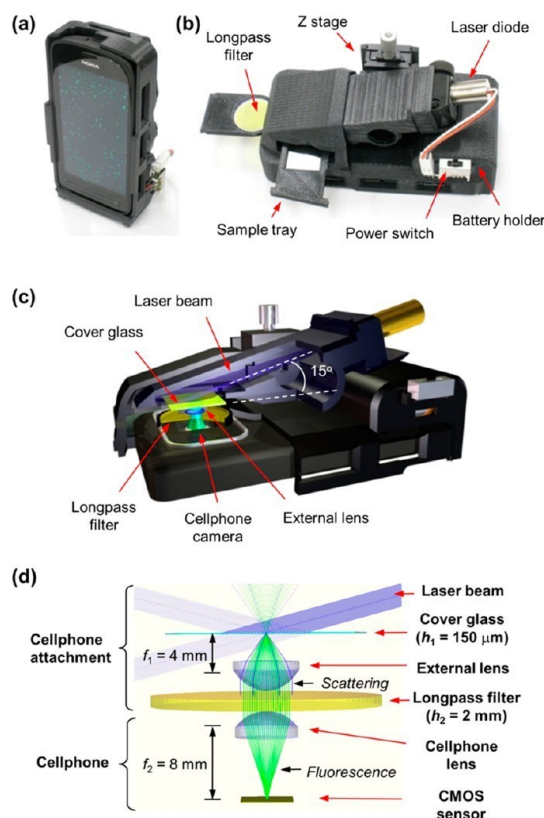
Kalibrace škály vlnové délky byla provedena pomocí 2 LED (červená a zelená) se známými charakteristikami. Rozlišení systému je především ovlivněno vlastnostmi kamery a displeje telefonu [9] (Pozn. Autoři neuvádějí přesný popis aplikace, zřejmě však odečítá hodnoty pro měření z displeje telefonu, nikoliv přímo ze senzoru.).



## 2.3 Fluorescence a Fluorimetrie

Fluorescence patří mezi fotoluminiscenční záření. Jednoduše řečeno je principem fluorescenčních měření ozáření látky excitačním zářením, čímž dojde k přechodu elektronů do excitovaných stavů. Při návratu do původního stavu elektrony vyzáří emisní fluorescenční záření s vlnovou délkou větší nebo rovnou vlnové délce excitačního záření. Fluorofory lze obecně dělit na vlastní (přírodně se vyskytující) a nevlastní (značky a sondy). Mezi analytickými metodami našla fluorescence uplatnění především při pozorování objektů ve fluorescenční mikroskopii, ve spektrofluorimetrech a fluorescenčních skenerech při měření intenzity záření (koncentrace látky), a v průtokových cytometrech [19].

Jednoduchý fluorescenční mikroskop s využitím mobilního telefonu demonstruje práce [17]. Autoři zkonstruovali sestavu propojitelnou s telefonem, která slouží jako držák pro vzorek, zdroj excitačního záření, a obsahuje několik optických prvků. Pouzdro je vyrobeno pomocí 3D tisku.

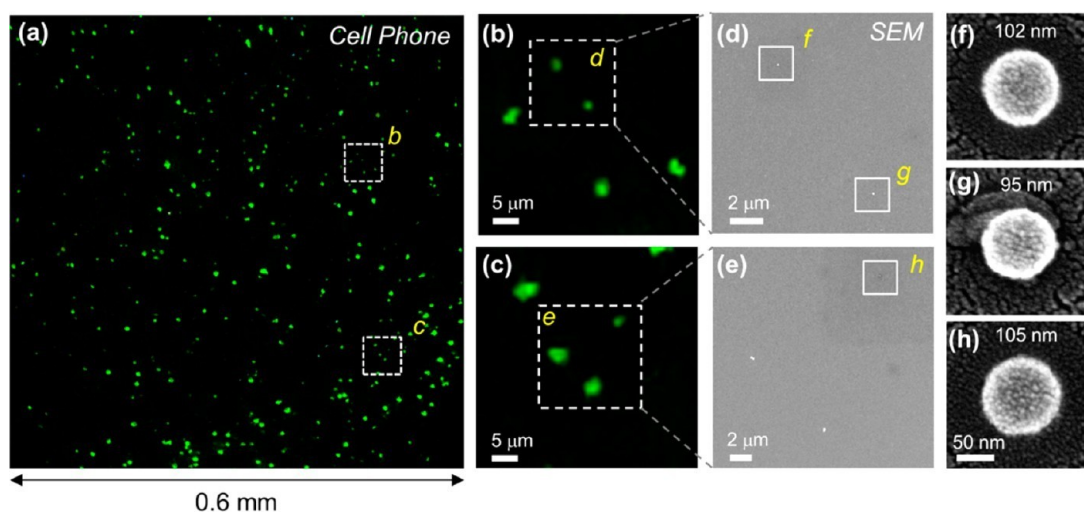


Obrázek 9: Jednoduchý fluorescenční mikroskop pomocí mobilního telefonu. Zdroj [17]

Laserová dioda (450 nm, napájeno 3xAAA baterie) svým zářením excituje fluorofory ve vzorku. Produkované emisní záření prochází 2 optickými čočkami (kamery mobilního telefonu a externí), mezi kterými je optický filtr nepropouštějící odražené excitační záření (pásmová zadrž 500 nm).

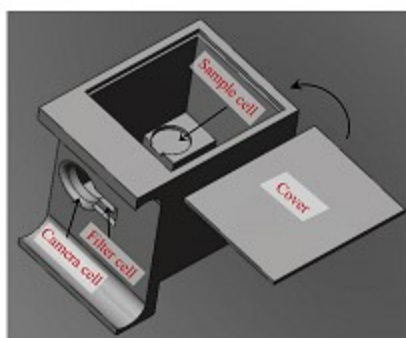
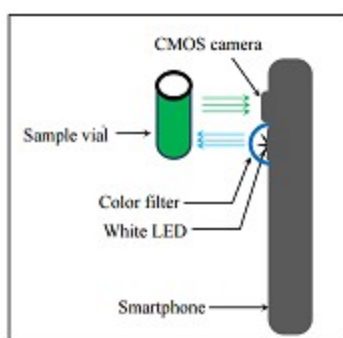
Externí čočka poskytuje 2násobné zvětšení. Laserová dioda s výkonem 75mW, ozařující pod úhlem 75°, spolu s filtrem a čočkou s nízkou numerickou aperturou, zvyšují SNR [17].

Dle prezentovaných výsledků může toto řešení sloužit především pro detekci a kvantifikaci přítomnosti elementů o velikosti virů a nanočástic, kdy není zapotřebí pozorování konkrétních tvarů. Testování autoři provedli na 100nm polystyrenových fluorescentních nanočásticích a lidském cytomegaloviru (HCMV). Své výsledky validovali pomocí elektronového mikroskopu [17].



Obrázek 10: Výsledný snímek a porovnání s výsledky elektronového mikroskopu. Zdroj: [17]

Fluorimetrií pomocí mobilních telefonů se zabývá práce [18]. Autoři vypracovali pomocí 3D tisku jednoduché pouzdro, obsahující průzor, optický filtr a prostor pro vzorek s fluoroforem. Excitaci provádí přísvětlovací dioda telefonu, přičemž světlo prochází přes filtr (pásmová propust', 450 nm). Kamera telefonu pak snímá emitované zelené fluorescenční záření ze vzorku. Vyhodnocení provádí aplikace v telefonu. Protože emitované záření se nachází v zelené části spektra a na vzorek díky pouzdru nedopadá vnější světlo, lze přímo využít RGB barevný prostor. Autoři uvádějí, že černé stěny pouzdra dostatečně redukují excitační záření a vyhodnocení se provádí z fixního ROI (region of interest), žádné další korekce neuvádějí [18]. Vyhodnocení probíhá podobně jako u kolorimetrie (vzorky o známé koncentraci, kalibrační křivka).

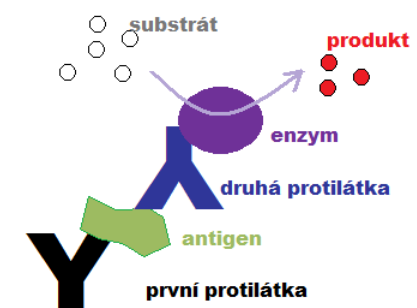


**Obrázek 11: Fluorimetrie pomocí mobilního telefonu. Nahoře schéma systému, dole vizualizace pouzdra. Zdroj [18]**

V rámci práce je systém využit pro měření pH. Intenzita fluorescenčního záření je nepřímo úměrná měřené hodnotě pH. Výsledky jsou validovány pomocí laboratorního spektrofluorimetru [18].

## 2.4 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) patří mezi nejpoužívanější imunologické biochemické metody. Cílem je kvantitativní stanovení měřených antigenů nebo protilátek. Přestože existuje několik variant provedení (přímá, nepřímá, sandwichová, kompetitivní), základem všech je specifická vazba antigen-protilátka. Ve všech metodách je jedním z účastníků reakce protilátka s navázaným enzymem. Po promytí odpovídá koncentrace této protilátky koncentraci měřeného antigenu/protilátky. Po přidání enzymového substrátu se rozvíjí nejčastěji barevná nebo fluorescenční reakce (méně často elektrochemická). Po spektrofotometrickém nebo fluorescenčním měření lze z intenzity záření odvodit koncentraci zkoumané látky [22].



Obrázek 12: Sandwichová ELISA. Zdroj: wikiskripta.eu

Protože se ELISA používá jako test na některá infekční onemocnění, zasahující především chudší oblasti světa (Ebola) [23], lze na využití mobilních telefonů ve spojení s touto metodou nahlížet jako na možnost zvýšení dostupnosti a snížení nákladů pro práci v nízko-zdrojových oblastech (v porovnání s vybavením ve větších městech či finančně vyspělejších státech). Autoři několika prací se demonstrují řešení, která pomocí mobilních telefonů plní funkci čteček mikrotitračních destiček. Volí přitom konstrukčně značně odlišené přístupy.



Obrázek 13: Mikrotitrační destička a klasická čtečka. Zdroj: bio-rad.com

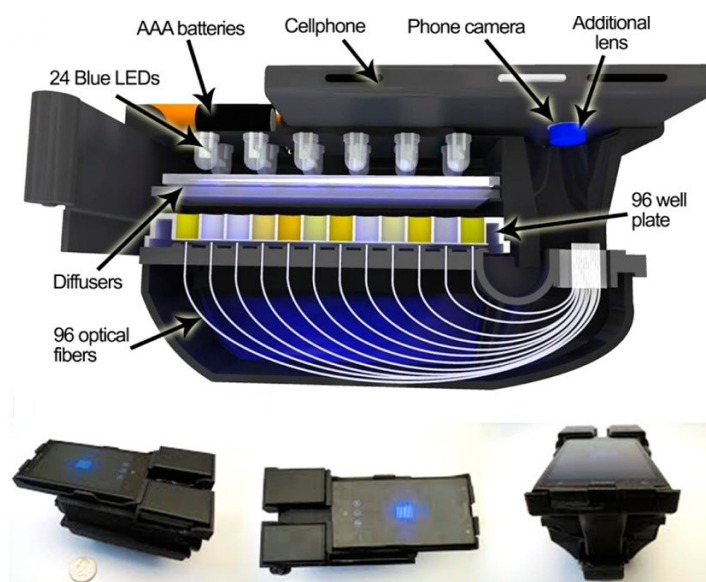
Autoři [7] ukazují přístup založený především na zpracování obrazu a sestavení vlastního ELISA mikročipu. Místo klasické jamkové destičky vytvořili mikročip se třemi dutinami, ve kterých probíhá sandwichová ELISA. Práce se zaměřuje konkrétně na detekci a kvantifikaci HE4 – biomarkeru karcinomu ovaria, v moči. Autoři připravili několik vzorků se známou koncentrací pro kalibraci měření. Po vnesení vzorků pomocí pipet a rozvinutí barevné reakce je telefonem pořízen snímek mikročipu (alternativně byl použit samostatný CCD čip).

Mobilní aplikace měří průměrnou hodnotu intenzity v R kanálu (RGB) v oblastech zájmu. Těmi jsou tři dutiny se vzorky a malá výseč předpokládaného pozadí. Ze změřených hodnot intenzity v oblasti dutinek se vzorky, a známých koncentrací standardů sestaví aplikace kalibrační křivku. Hodnotu intenzity pozadí využije při dalších měřeních s neznámými vzorky k normalizaci hodnot. Kalibrační křivka pro každé měření je upravena dle rozdílu v pozadích mezi měřením standardů a neznámých vzorků. Tímto se eliminují rozdíly v osvětlení mezi jednotlivými měřeními. Z korigované kalibrační křivky pak aplikace vypočítá žádanou koncentraci neznámých vzorků v daném měření.



Obrázek 14: Vyhodnocení ELISA pomocí mobilního telefonu. Vlevo ilustrace snímání, vpravo uživatelské rozhraní mobilní aplikace. Zdroj [7]

Robustní řešení demonstrují autoři [8]. Jejich práce se nevěnuje konkrétní ELISA aplikaci, výsledkem je mobilní čtečka, de facto jednoduchá analogie klasického readeru, vhodná pro různá měření s klasickou 96jamkovou destičkou. Pomocí 3D tisku bylo vytvořeno pouzdro, připojitelné k mobilnímu telefonu. Prostor pro vzorky je shora osvětlen 24 modrých LED, pod nimiž je plošný difuzér, zajišťující rovnoměrné osvětlení celé destičky. Pod destičkou prošlé světlo vstupuje do 96 nezávislých optických vláken, jedno vlákno pod každou z 96 jamek, která převádějí světlo od destičky k optickému senzoru telefonu. Samotný mobilní telefon pak neprovádí analýzu, nýbrž pomocí běžící aplikace odesílá data na server, který provádí jak kvalitativní, tak kvantitativní kolorimetrickou analýzu. Telefon tak slouží především jako uživatelské rozhraní. LED jsou napájeny pomocí 6 AAA článků, umístěných v pouzdře. Testování proběhlo na vzorcích příušnic, spalniček a herpes simplex viru 1 a 2. Autorům se podařilo dosáhnout velmi vysoké přesnosti, přesahující 99 %.



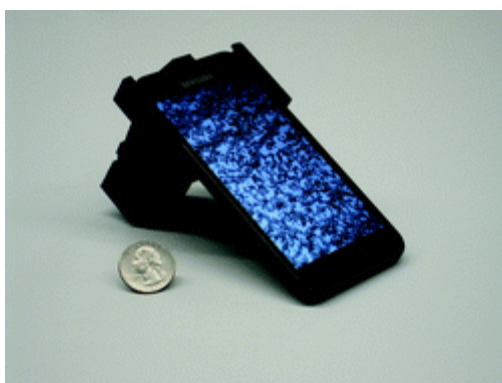
Obrázek 15: Schéma a fotografie čtečky 96jamkových destiček. Zdroj [8]

V obchodech s aplikacemi pro iOS a Android lze také nalézt aplikace, které provádějí měření přímo z fotografie destičky, např. Enzo ELISA Plate Reader [16]. Popis aplikace na stránkách výrobce uvádí 90% korelaci se spektrofotometrickými výsledky a schopnost analýzy na 5 vlnových délkách [16]. Technické podrobnosti však nebylo možné dohledat.

## 2.5 Mikroskopie

Mikroskop je dnes již klasický přístroj pro pozorování objektů miniaturních rozměrů, s dlouhou historií sahající až do 17. století, mající dnes velké množství variant od standardních optických, přes fázové, až po elektronové mikroskopy. Pokusy převést konstrukci optického mikroskopu do mobilního telefonu nejsou nijak výjimečné, dané práce obvykle napodobují klasickou mikroskopii ve světlém poli (fluorescenční mikroskopie je zmíněna v dřívější kapitole) a s konstrukcí zahrnující čočky a tubus. Některá řešení spoléhají na propracovanou analýzu obrazu, čímž mohou vynechat nejkritičtější a nejdražší komponenty - optické čočky. Například holografický mikroskop, ve kterém se vzorek prosvětlí pomocí LED přes miniaturní otvor a interferencí se světlem v pozadí, vzniká holografický obraz. Nutnou součástí je pak komplikovaná analýza obrazu [6]. Obecně je doplnění samotných „mikroskopů“ o mobilní aplikace s různými funkcemi poměrně časté (nejen analýza obrazu, ale i cytometrie, odesílání dat apod.).[6]

Zajímavé řešení vyvinuli autoři práce [15]. Konstrukteři zde využili pro přenos obrazu ke kameře telefonu optických vláken, uchycených v pouzdře (vytvořeno pomocí 3D tisku) schopném rotace okolo své osy. Optická vlákna se směrem od vzorku ke kameře kuželovitě rozšiřují (taper). Zkoumaný vzorek je v kontaktu s jedním koncem optického kanálu. Při prosvětlení vzorku světelným zdrojem (např. LED) je na druhou stranu optického kanálu přenesen obraz zvětšený (3násobné zvětšení ve všech směrech). Tento obraz je pak promítán na kameru mobilního telefonu. Mezi optická vlákna a kameru lze ještě vložit optické čočky. Pro kompletní snímání je nutno provést několik operací, protože použití optických vláken představuje de facto vzorkování scény. Zatímco vzorek a kamera zůstávají ve fixní pozici, optický aparát rotuje, s krokem 1-2°. V každé pozici se pořídí snímek, výsledná sekvence snímků se následně fúzuje pomocí speciální mobilní aplikace a shift-and-add algoritmu. Tím je dosaženo zlepšení rozlišení a odstranění prostorových artefaktů.[15]

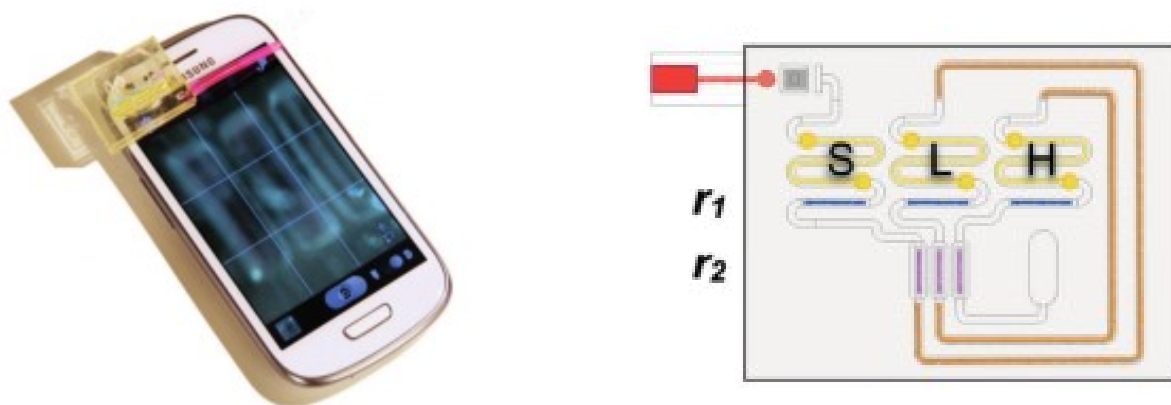


Obrázek 16: Mobilní mikroskop s optickými vlákny. Zdroj [15]



## 2.6 Mikrofluidní čipy

Řešení využívající architektury lab-on-chip (LOC). Obvykle se jedná o malá pouzdra, často jednorázová. Obsahují systém mikrokapilár a dutinek, přes které proudí tekuté látky ve velmi malých objemech. Tělo LOC může být vytvořeno pomocí 3D tisku, některá řešení využívají papírový podklad. Použité reagentie mohou být do LOC přidány až před měřením, nebo mohou být naplněny již při výrobě, pokud to charakter použitých látek vzhledem ke skladování umožňuje (skladování při určité teplotě, rozklad účinné látky v průběhu času apod.). Druhý jmenovaný způsob pak zrychluje a zjednodušuje manipulaci před samotným měřením.[20]



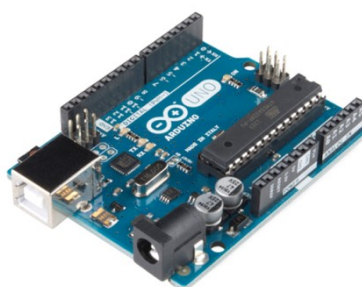
Obrázek 17: Mikrofluidní lab-on-chip pro měření koncentrace glukózy ve vzorku. Zdroj: [4]

Konkrétní řešení: Autoři [4] využívají pro měření hladiny glukózy malé jednorázové pouzdro se systémem kapilár a dutinek s předpřipravenými reagentii. Pouzdro je vybaveno malou optickou čočkou pro rozšíření zorného pole, snímání probíhá pomocí kamery mobilního telefonu (obvykle přední). Celé LOC se přikládá přímo ke kameře. Systém obsahuje předpřipravené kalibrační vzorky s nízkou a vysokou koncentrací glukózy pro kalibraci. Vložení vzorku do systému a zahájení pohybu látek v kapilárách realizováno stisky silikonové trubičky, plnící funkci pumpy. Průchodem analyzovaného vzorku a obou kalibračních vzorků dutinkami s reagentii dochází ke změnám jejich barev. Po úplném smíchání všech reagentií s každým vzorkem je zahájeno měření časového úseku, ve kterém se vyvíjí intenzita barevného odstínu. Čas, za který dosáhne daný vzorek maximální barevné intenzity, je úměrný jeho koncentraci. Protože závislost potřebného času a koncentrace je lineární a jsou známy 2 kalibrační hodnoty, lze sestavit kalibrační křivku a zjistit koncentraci neznámého vzorku. Za tímto účelem lze vývoj nahrávat do paměti telefonu ve formě videa. Tento přístup elegantně obchází problematiku osvětlení (vše lze provádět při ambientním osvětlení) a rozdíly v konstrukcích a vybavení mezi různými modely telefonů. Prakticky nezáleží na parametrech kamery telefonu (v rámci běžně dostupných modelů) ani na jejich tvaru. Zároveň není potřebná žádná další mobilní aplikace, pouze standardní, obsluhující kameru.[4]



## 2.7 Využití mikroprocesorově řízeného modulu

Obecně lze říci, že zakomponováním mikroprocesorově řízeného modulu do technického řešení se výrazně rozšiřují možnosti použití mobilních telefonů o další metody či jejich varianty. Jedná se především o moduly, které umožňují ovládat a číst nejen digitální, ale i analogové vstupy a výstupy. Mimo optické snímání prováděné kamerou telefonu se pak nabízí řada dalších snímačů, ať už světlocitlivých (na telefonu nezávislé CCD či CMOS, samostatné fotodiody a RGB senzory atd.) nebo např. elektrochemických (iontově selektivní elektrody apod.). Mobilní telefon pak zabezpečuje složitější práci s daty, jako obrazová a signálová analýza, sdílení dat, uživatelské rozhraní apod.



Obrázek 18: Arduino Uno R3. Zdroj: [www.explorelabs.com](http://www.explorelabs.com)

## 2.8 Obecné problémy a nevýhody

Kromě výhod přináší použití mobilních telefonů v biomedicíně samozřejmě i nevýhody či problémy, spojené s konkrétní realizací. Mezi časté neduhy spojené především s použitím externích pouzder, na která se telefony přikládají, patří adaptace pouzdra pouze na jeden model telefonu. Může se jednat o nemožnost vsadit jiný telefon do prostoru k tomu určenému, častěji však na sebe nenavazují kamera či přisvětlovací prvek telefonu a prvky pouzdra pro ně určené. Lze však rozumně předpokládat, že v případě masovějšího využití by byl tento problém vyřešen adaptabilním nastavcem, nebo přímo přepracováním pouzder na nastavitelná.

Některá řešení jsou vytvořena pro použití jen na jednu konkrétní aplikaci. Tato determinovanost je určena například použitými reagensy nebo komponentami. Zároveň mobilní řešení obvykle disponují jen nízkou nebo nulovou mírou automatizace. Toto negativum se projeví především při zpracování většího množství vzorků. Je nutné však uvést, že toto negativum stojí v protikladu k jednoduchosti a nízkým nákladům, které jsou obvykle hlavními motivy vývoje těchto zařízení.

Spolehlivost telefonu může být při použití kritickým článkem. Protože většina uvedených metod spočívá v přímém použití telefonu, a zároveň je telefon obvykle nejsložitější součástí celého řešení, může jakékoliv, především skryté, nestandardní chování

telefonu zkreslit podané výsledky. Lze však předpokládat, že závadu, která je obsluze zjevná, bude možné snadno kompenzovat nahrazením telefonu jiným kusem díky snadné dostupnosti a velké rozšířenosti mobilních telefonů v populaci.

Přesnost svých řešení obvykle autoři testují proti zavedeným vrcholovým přístrojům v dané kategorii. Přestože jsou prezentovaná řešení často schopna dosáhnout úctyhodných výsledků, obvykle se nejedná o kvalitu absolutně srovnatelnou. Vzhledem k tomu, že se jedná o přístroje, jejichž výsledky měření mohou mít vliv na lidský život, lze právě toto považovat za největší bariéru proti většímu rozšíření ve světě. Tento fakt jde také ruku v ruce s nedůvěrou, kterou může náhrada drahého a komplexního přístroje malým, levným a na mobilním telefonu založeným řešením, vzbuzovat.

Pro výše uvedené důvody je zatím širší použití mobilních telefonů pro biomedicínské aplikace ve vyspělém prostředí nepravděpodobné. Lze si však představit úspěšné použití v prostředí, kde jsou tradiční zdroje těžko dostupné, kde jsou kladeny vysoké požadavky na cenovou dostupnost, a kde mohou být požadovaná rychle dostupná, na obsluhu a energii nenáročná technická řešení, u kterých nebude nejvyšší přesnost a robustnost laboratorních přístrojů úplnou prioritou. Také lze uvažovat o uplatnění v prostředí těch výzkumů, ve kterých není vysoká přesnost a široká paleta schopností laboratorních přístrojů pro účely daného výzkumu nutností, a použití mobilních telefonů by ušetřilo významnou část finančních prostředků nebo času.

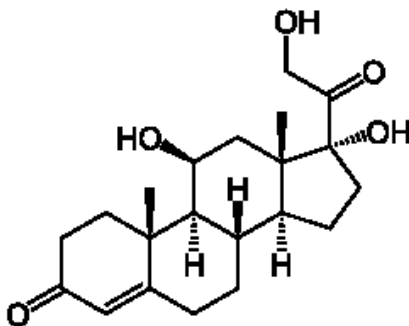
### 3 Návrh realizace řešení pro měření hladiny kortizolu pomocí mobilního telefonu

Cílem této části je vytvořit návrh řešení s využitím mobilního telefonu, pomocí kterého bude možné experimentálně stanovovat hladinu kortizolu ve slinách, která dle v současnosti dostupných informací významně koreluje s hladinou kortizolu v séru [10][11][12].

#### 3.1 Kortizol

Kortizol je hormon patřící mezi glukokortikoidy, hormony produkované adrenálním kortexem (kůra nadledvin). Jedná se o hlavní stresový kortikosteroid. Produkce kortizolu je řízena osou HPA (hypotalamus-hypofýza-nadledviny). V této ose působí CRH (kortikoliberin, hypotalamus) na produkci ACTH (adrenokortikotropní hormon, adenohypofýza), který následně působí na produkci kortizolu (nadledviny). Regulace produkce probíhá pomocí negativní zpětné vazby. V krvi je většina kortizolu vázána na CBP (cortisol binding protein), malá část je vázána na albumin, zbytek je ve volné formě [13].

Právě pouze volný kortizol má biologické účinky. Mechanismem účinku kortizolu je působení na GR receptor (glucocorticoid receptor) v cytoplazmě, který se po navázání kortizolu přesouvá do jádra, kde působí jako transkripční faktor (případně působí na transkripci genů pomocí interakcí s jinými proteiny v jádře nebo cytosolu). Úlohou kortizolu jako stresového hormonu je udržování fyziologické homeostázy při stresové reakci, mobilizace energetických zdrojů a utlumení procesů energi spotřebovávajících a po dobu trvání stresové reakce nepotřebných. Je za hodno zmínit několik mechanismů, pomocí kterých kortizol plní své funkce (uvádět plný výčet však nekoresponduje s cíli této práce). Zvyšuje hladinu glukózy v krvi jednak uvolňováním buněčných zásob, a dále pomocí glukoneogeneze. Stimuluje glykogenezi a lipolýzu (především v dolních končetinách, naopak ovšem podporuje ukládání tuku v trupu a obličejí). Katabolický působí především na svalové a pojivové proteiny. Zesiluje demineralizaci kostní tkáně. Ovlivňuje CNS (zvyšuje dráždivost), zmírňuje imunitní reakce a zpomaluje hojení ran [13].



Obrázek 19: Strukturní vzorec kortizolu. Zdroj: darthmouth.edu

Mimo zvýšené sekrece při akutní stresové reakci je kortizol v krvi přítomen v bazálních koncentracích i za běžných podmínek. Uvolňován je v pravidelném cirkadiánním rytmu. Koncentrace vykazuje tři hlavní maxima: ranní, okolo poledne, a odpolední. Bazální koncentrace slouží k regulaci některých metabolických aktivit (mozek, ledviny, játra) a diferenciaci některých tkání (tuková) [13].

Patologické stavy může způsobovat jak snížená, tak zvýšená produkce kortizolu. V případě snížené produkce hovoříme o Addisonově chorobě. Obvykle je hypokortizolismus způsoben adrenální insuficiencí, primární nebo sekundární (problém přímo v nadledvinách nebo v hypofýze, která se účastní regulace kortizolu). Při zvýšené produkci (hyperkortizolismus) se jedná o Cushingův syndrom. Opět lze dělit na primární – příčinou zvýšené hladiny kortizolu je porucha nadledvin nebo terapeutické podávání kortizolu, a sekundární – příčinou je problém v hypofýze. Měření hladiny kortizolu se provádí, mimo jiné, právě při podezření na tyto choroby [13].

#### **Referenční hodnoty [10]:**

ranní.: 100-750 ng/dL

odpolední.: <401 ng/dL

noční: <100 ng/dL

### **3.2 Princip řešení**

Jako analytická metoda pro měření hladiny kortizolu byla vybrána ELISA, pro svou všeobecnou rozšířenost a dostupnost hotových měřicích kitů. Řešení předpokládá pořízení hotového kitu pro měření hladiny kortizolu ve slinách pomocí metody ELISA, ve vyhotovení s 96jamkovou titrační destičkou a všemi potřebnými reagensy.

Principiálně se navrhovaný systém skládá ze tří funkčních částí: snímací blok, řídicí blok, a mobilní telefon. Kompletní systém je umístěn v uzavřeném pouzdře.

Návrh obsahuje vypracování dvou variant řešení, lišících se mezi sebou navrhovaným způsobem realizace snímání a ovládání:

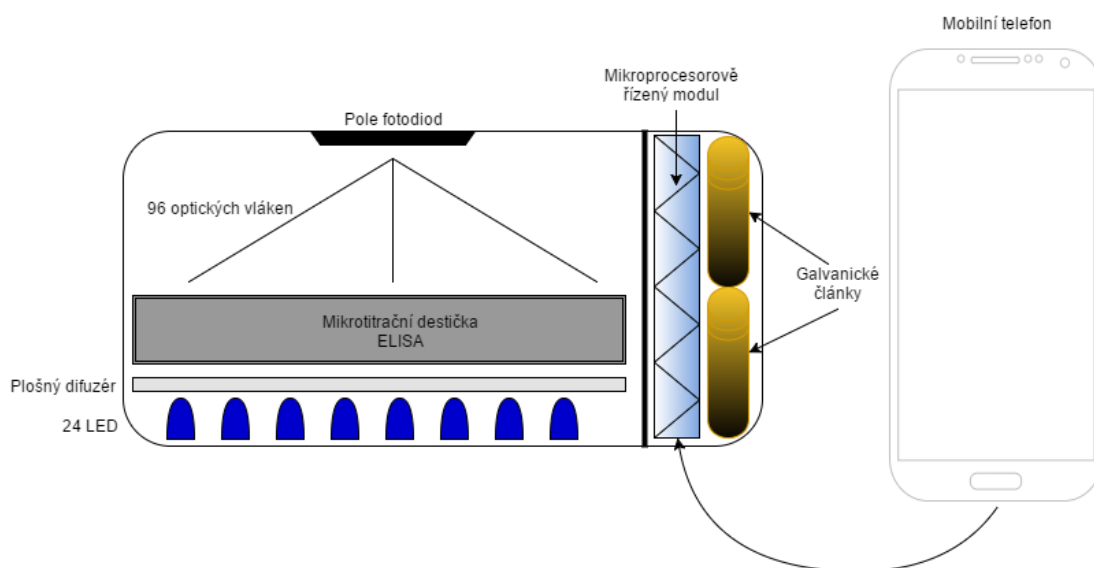
- a) detektor systému je realizován pomocí pole fotodiod, snímací blok obsahuje skupinu optických světlovodných vláken, řídicí blok obsahuje mikroprocesorově ovládaný modul a galvanické články
- b) úlohu detektoru systému plní zadní kamera mobilního telefonu, řídicí blok obsahuje pouze napájení a spínač.

Snímací a řídicí blok jsou uzavřeny ve společném pouzdře. V případě varianty b) se mobilní telefon přikládá přímo na pouzdro, v případě varianty a) je poloha telefonu libovolná vzhledem k dosahu připojení. Pro vytvoření samotného pouzdra se předpokládá využití technologie 3D tisku.

### 3.3 Varianta konstrukce A

Snímací blok je realizován pomocí komůrky, do které se vkládá mikrotitračních destička. Pod destičkou se nachází 24 LED (barva dle absorbance zvoleného kitu, 1 LED pro 4 jamky), napájených galvanickými články. Pro co nejvyšší homogenitu prosvětlení jamek destičky je nutné vložit mezi destičku a LED plošný difuzér (je nutno počítat s útlumem). Nad destičkou je umístěno 96 optických světlovodných vláken, která vedou světlo prošlé destičkou k detektoru (pole fotodiod). Samotné pole fotodiod musí obsahovat minimálně stejně nebo více jednotlivých diod, než je použitých optických vláken. Při konstrukci pouzdra je nutno brát v úvahu maximální možný ohyb jednotlivých vláken, tak aby nedocházelo k významným ztrátám v přenosu nebo poškození vláken. Vývody optických vláken jsou umístěny tak, aby každé vlákno bylo ve velmi blízké či bezprostřední vzdálenosti od jedné diody detektoru.

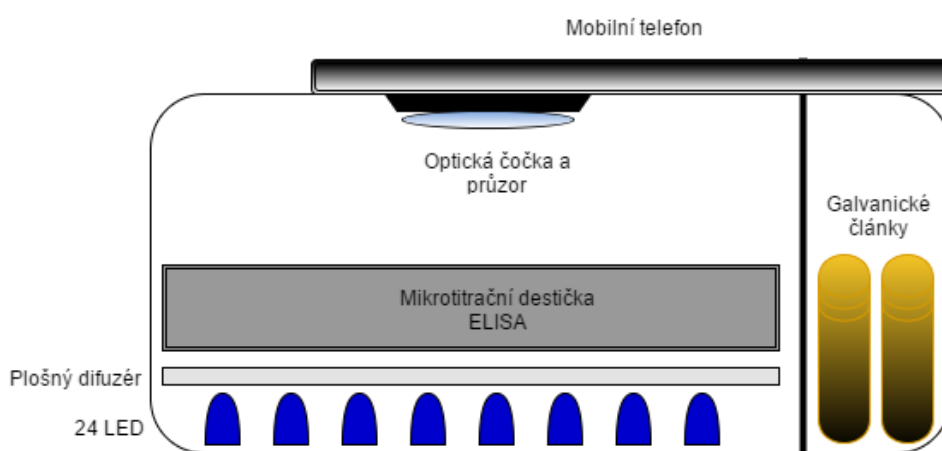
Detektor je připojen ke vstupně/výstupním pinům mikroprocesorově řízeného modulu. Předpokládá se instalace takového pole fotodiod, které umožňuje sekvenční čtení hodnot z jednotlivých diod. Předpokládá se vytvoření zdrojového kódu pro mikroprocesorově řízený modul, který umožní ovládat pole fotodiod, spínat obvod s LED a posílat data do mobilního telefonu. Samotný modul bude napájen pomocí galvanických článků. Dále je nutné využít, popřípadě vytvořit, aplikaci, která umožní data odeslaná z modulu zobrazit na displeji. Aplikaci bude nutné doplnit o výpočet hodnoty koncentrace z přijatých dat a kalibrační křivky.



Obrázek 20: Jednoduché schéma návrhu praktické realizace: varianta a)

### 3.4 Varianta konstrukce B

Tato varianta konstrukčně vychází z předchozího řešení, počítá však s využitím zadní kamery mobilního telefonu jako detektoru. Telefon je položen na vrchní straně pouzdra, kamera přiložena k průzoru na vrchní straně pouzdra. Návrh nepočítá s mikroprocesorově řízeným modulem, ani s optickými vlákny. Místo vláken je nad mikrotitrační destičkou, pod průzorem kamery, umístěna optická čočka, která zajišťuje, aby všechny jamky destičky byly v zorném poli kamery. Stisknutím spínače dojde k rozsvícení LED a telefonem lze manuálně pořídit fotografický snímek. Důležitým článkem této varianty je funkčně jednoduchá mobilní aplikace (pro Android), která provede kolorimetrické vyhodnocení měření na základě analýzy pořízeného snímku.



Obrázek 21: Jednoduché schéma návrhu praktické realizace: varianta b)

## **4 Praktická realizace analytického systému**

Cílem práce je komplexně realizovat právě jedno technické řešení. Po zralé úvaze bylo rozhodnuto o implementaci druhého navrhovaného řešení, varianty B, a to s jistými technickými úpravami, odpovídajícími aktuální dostupnosti zdrojů a průběžným poznatkům. Tato varianta využívá mobilní telefon mimo nejen pro výpočetní sílu, ale také jako akviziční systém a základní platformu pro práci a měření.

### **4.1 Hardware**

#### **4.1.1 Mobilní telefony**

Měření koncentrace vzorků v mikrotitrační destičce lze pomocí telefonu realizovat na bázi několika různých způsobů, z nichž některé obsahují krom samotného telefonu s příslušným software také další přídavný hardware či zařízení – jedná se například o různé měřicí přípravky, jednodeskové počítače nebo i komplexnější zařízení.

Tato práce má za cíl zabývat se právě jedním technickým řešením přídavného hardware, navržené řešení realizovat, otestovat a optimalizovat, případně s ohledem na dostupné zdroje minimálně navrhnout adekvátní postupy pro optimalizaci.

Pro účely této práce byly použity dva mobilní telefony a jeden tablet. Jedná se o modely LG G2, Samsung S3 Neo a tablet iPad mini. Hlavním telefonem používaných během práce byl LG G2 s operačním systémem Android ve verzi 5.0.2. Jedná se spíše o větší telefon, vybavený relativně dobrým fotoaparátem. Jedná se o 13MPix CMOS čipem Sony IMX135 Exmor RS, s clonovým číslem F2.4 a ohniskovou vzdáleností 4 mm (35 mm ekvivalent činí 29.5 mm). Aplikace fotoaparátu umožňuje mimo jiné ovládat ISO, jas, vyvážení bílé a také umožňuje manuální ostření.



**Obrázek 22:** Propagační snímek společnosti LG k modelu G2

Samsung S3 Neo je o něco menší telefon, také s operačním systémem Android, tentokrát ve verzi 4.4.2. Vybaven je fotoaparátem s 8MPix CMOS čipem, clonové číslo F2.6, ohnisková vzdálenost a model čipu nebyly spolehlivě doloženy. Aplikace fotoaparátu je zásadě podobná výše zmíněnému.

Tablet iPad mini byl pro měření ze zajímavosti také zkoušen, přestože se nejedná o mobilní telefon. Kvůli svým rozměrům a nevhodnému fotoaparátu však byl záhy z pokusů vyřazen. Není na něm také možné nastavovat některé parametry focení – ISO, čas závěrky apod. Naopak velkou výhodou je větší dotykový display a tedy lepší uživatelská přívětivost, proto při vývoji sloužil jako platforma pro Matlab Mobile, na které probíhala práce s funkcemi pro zpracování snímků (při měřeních lze z principu provozovat více různých zařízení zároveň, podmínkou je přístup ke cloudu. Lze tak např. na jednom zařízení fotit a na druhém spouštět připravené funkce).

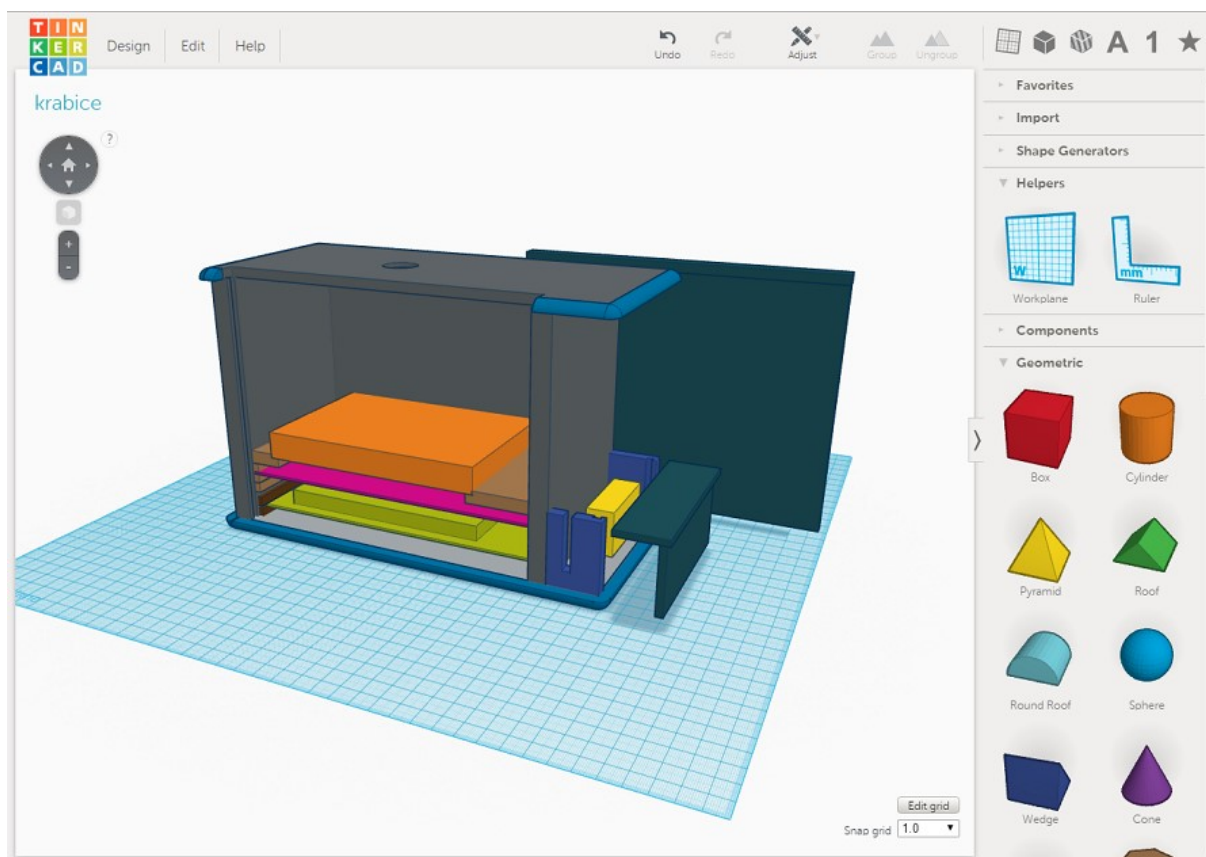
Jako hlavní fotografující telefon sloužil LG G2, a to především z důvodu širšího zorného pole, které umožňuje bezpečně zabrat v obraze celou mikrotitrační destičku i s rezervou pro případný nevhodný posun telefonu.

#### **4.1.2 Pouzdro**

Jak již bylo zmíněno dříve, zde předkládání zařízení je založeno na principu kvádrového uzavřeného boxu s otvorem na vrchní straně, skrz nějž je fotografována mikrotitrační destička, prosvětlená panely LED přes vrstvy světelného difuzoru. Tato metoda eliminuje vliv okolního světla na měření.

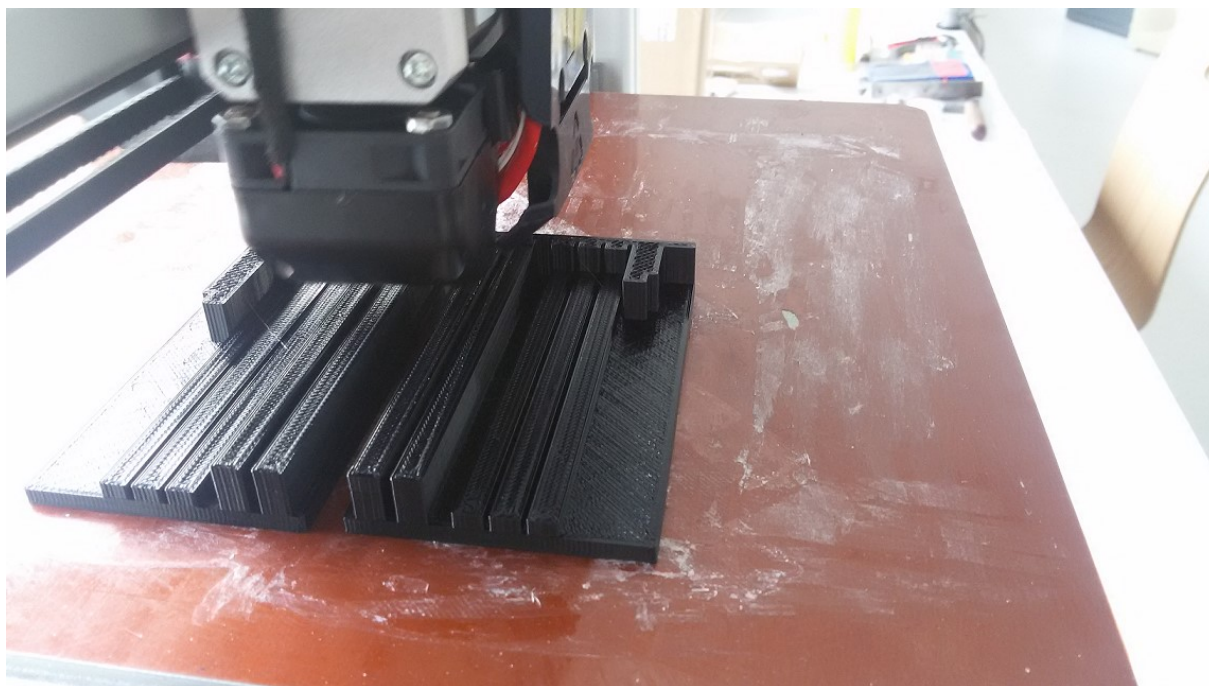


Jako konstrukční metoda byl původně zvolen 3D tisk z materiálu PLA (Polylactid acid). Navrhování a modelace konstrukce zařízení probíhalo ve volně dostupném webovém návrhovém prostředí Tinkercad (po registraci dostupné na [www.tinkercad.com](http://www.tinkercad.com)). Toto prostředí bylo zvoleno krom volné dostupnosti také pro svou jednoduchost a uživatelskou přívětivost, díky které bylo možno se s ním rychle naučit pracovat. Obsahuje množství základních plných tvarů a mezer a umožňuje základní prostorové změny, především velikostní. Daní za jednoduchost a pak právě absence složitějších, avšak často užitečných prvků. Pro účely této práce však byl Tinkercad plně dostačující.



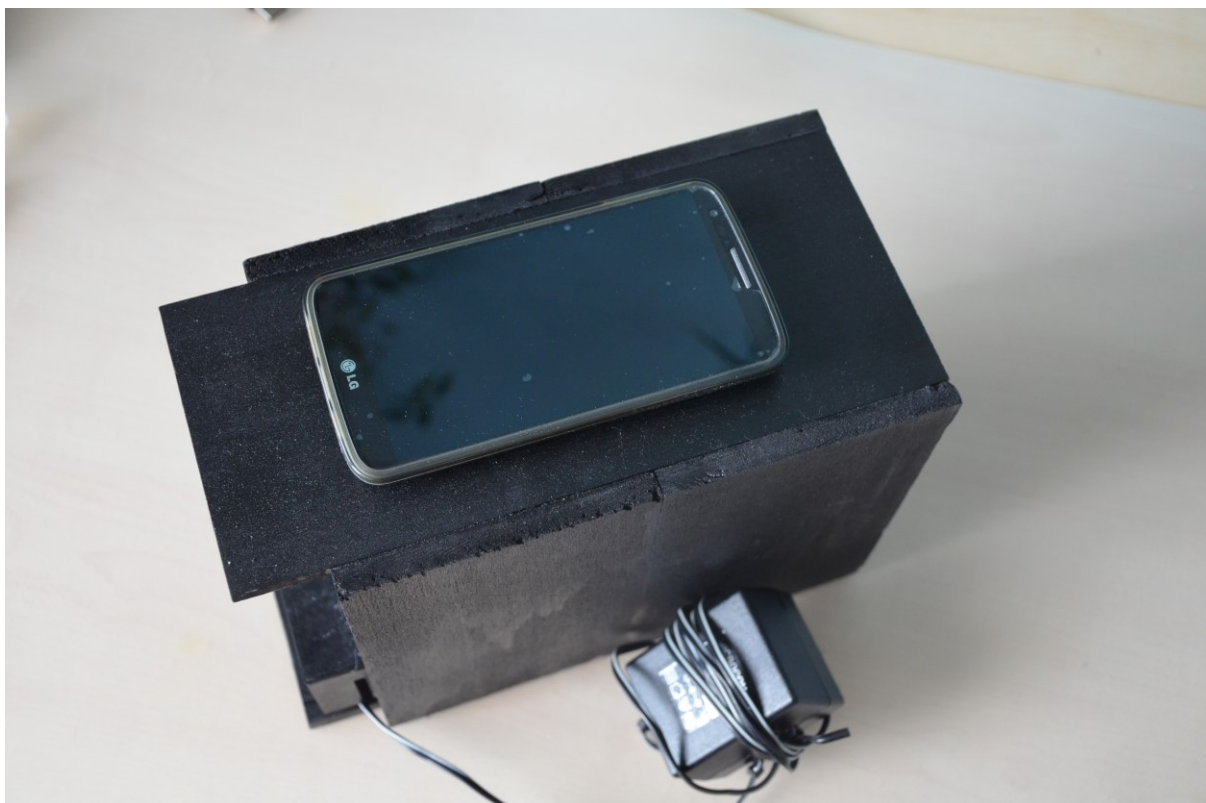
Původně byla celá konstrukce navržena pro 3D tisk, a to i s důrazem na robustnost. Postupem času však byl tento přístup částečně opuštěn a to především za účelem úspory finančních zdrojů, tiskového materiálu a tiskového času, neb původní návrh by vyžadoval více než 24 hodin nepřetržitého tisku. Některé části však byly v modelu zachovány, především ty, u kterých by se manuální výroba vyznačovala vyšší náročností. Jedná se především o držák s lištami, ve kterém jsou uchyceny vzorky, difuzory a světelné zdroje, dále pak malý přístřešek na boční straně, sloužící ke krytí napájecího výstupu, případně k ukrytí baterie. Pro výrobu ostatních částí, především destiček s větší plochou, byly pořízeny pruhy balsového dřeva. Za účelem využití standardizovaných rozměrů pruhů byl model konstrukce mírně přepracován, pruhy dřeva byly nařezány na destičky požadovaných rozměrů a slepeny k sobě domácím univerzálním lepidlem Herkules.

Výsledný produkt je de facto složen ze tří hlavních bloků. Prvním je báze zařízení, složená ze dna a lištové konstrukce, osazené vzorkem, difuzory a osvětlovací jednotkou. Dno je vyrobeno z pruhu balsového dřeva o rozměrech 225 x 100 x 9 mm. Více ke straně dna je připevněna lištová konstrukce, vyrobená 3D tiskem, o vnějších rozměrech 183 x 93 mm. Ta je složena ze tří na výšku stojících pravoúhlých destiček, na nichž je natištěno pět úzkých lišt, mezi které je možné vkládat desku s osvětlovací jednotkou a difuzory. Nad lištami jsou natištěny dvě nosné plochy s výřezem po stranách, do kterých se vkládá mikrotitrační destička se vzorky. Vzdálenosti mezi plochami odpovídá přesně velikosti destičky, tedy 128 mm. Na pravé straně konstrukce je vytvořen otvor pro připojení osvětlovací jednotky k napájení. 3D tisk této části zabral přibližně šest hodin času.



**Obrázek 23: 3D tiskárna UBMI během tisku lištové konstrukce**

Druhým blokem je velký nasazovací kryt o rozměrech 200 x 118 x 160 mm. Slouží k zamezení přístupu okolního světla ke vzorku a jako podstavec pod mobilní telefon. Celý je vyroben z nařezaného balsového dřeva a na horní straně disponuje rozšířením, korespondujícím s rozměry dna, pro lepší stabilitu telefonu (spíše pro případ použití většího zařízení). Také je zde vyřezán kruhový otvor o průměru přibližně 2 cm jako průzor pro fotoaparát mobilního telefonu. Kryt je poměrně vysoký proto, aby zajistil telefonu dostatečné zorné pole, při kterém bude pozorovatelná celá destička se vzorky a byly znatelné také hrany destičky (využíváno k softwarovému zpracování). Výška krytu nad destičkou činí přibližně 11 cm. Při výměně vzorku je třeba celý velký kryt sejmout, je vhodné při tom dbát na stálou pozici telefonu (usnadňuje obrazové zpracování), ovšem vzhledem k materiálu krytu a jeho nabarvení není udržení telefonu ve stále pozici a při pohybu nijak složité a stačí jen trocha opatrnosti.



**Obrázek 24: Kompletní analytický systém v uzavřeném stavu**

Naopak pro připojení a odpojení zdroje napájení od osvětlovací jednotky není nutno s krytem manipulovat, neboť v souladu s otvorem v lištové konstrukci je také v krytu vyřezán otvor, bez spodní hrany, umožňující vložení konektoru napájení.

Posledním blokem je malý kryt na boční straně zařízení. Ten slouží ke krytí napájecího konektoru, případně k ukrytí napájecí baterie, pokud je přítomna. Kryt je celý vyroben pomocí 3D tisku a výroba trvala přibližně jednu hodinu.

Všechny balsové části byly nabarveny černou barvou ve spreji. Tištěné komponenty jsou černé od výroby.

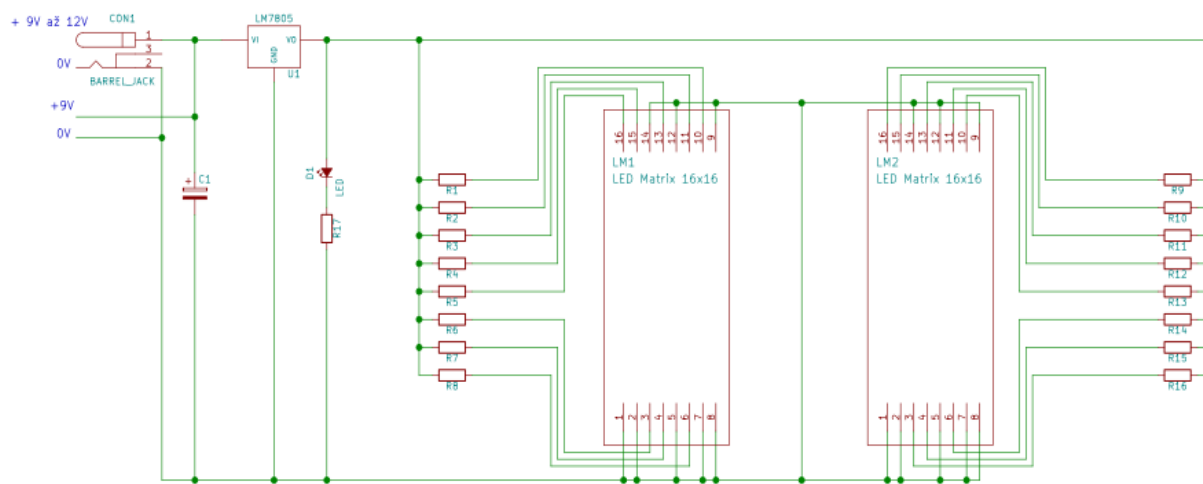
Kompletní model je k dispozici v příloze č. 3.

Jako zdroj procházejícího světla pro měření bylo postupně uvažováno několik možných zdrojů – 24 samostatných modrých LED, pravidelně rozmístěných mezi každé čtyři jamky tak, aby jedna LED svým světlem prozařovala převážně nejbližší jamky; 96 samostatných LED – jedna LED pro jednu jamku, a 2 64bodové LED matice, které pokrývají většinu plochy mikrotitrační destičky, avšak bez přímé vazby mezi konkrétními LED a jamkami.

Za technicky nejkorektnější řešení lze bezpochyby považovat 96 samostatných LED, vzhledem k jednoduchosti a praktičnosti však byla zvolena varianta s dvěma LED maticemi o 8x8 prvcích.

Zvolené měření vyžaduje prosvětlení světlem v modré oblasti spektra, proto byly pořízeny matice s modrými LED, s vyzařovacím maximem na 470 nm a FWHM 25 nm. Vyzařovací úhel ve specifikaci uveden, nicméně vzhledem k přítomnosti difuzoru není podstatný. Další specifikace jsou uvedeny v příložené dokumentaci [doc 2]. Jedna matice se skládá z 64 diod v zapojení se společnou katodou a vyvedenými 16 piny.

V rámci řešení byl navržen také elektrický obvod pro LED matice, obsahující několik prvků. Pro připojení napájení slouží DC konektor. Ten je možné spojit buď s 12V adaptérem nebo s 9V článkem se speciálním nastavcem. Obvod také obsahuje stabilizátor napětí LM7805 s výstupním napětím 5 V, který zajišťuje kompatibilitu obvodu s jinou velikostí vstupního napětí, při zachování stálého napětí na LED panelech. Dále je přítomno 32 rezistorů o odporu 220  $\Omega$  pro snížení napětí na jednotlivých LED na přibližně 2,9 V, což dle voltampérové charakteristiky LED odpovídá přibližně 10 mA, což dále dle grafu závislosti svítivosti na procházejícím proudu odpovídá přibližně 80 – 90 % relativní svítivosti. Tato svítivost se v praxi ukázala jako přebytná a byla jedním z důvodů pro přidání další vrstvy difuzoru (jednodušší řešení, než změna obvodu). Dále obvod obsahuje kondenzátor 470  $\mu$ F/10 V pro filtraci napětíových špiček.



Obrázek 25:Návrh DPS s obvodem v programu KiCad

Při měření je třeba brát v úvahu, že napětíový stabilizátor se průchodem relativně velkého proudu značně zahřívá, a je tedy vhodné nenechávat LED volně svítit, pokud neprobíhá focení. Snadné zapínání a vypínání umožňuje výše zmíněný spínač.

Realizace obvodu pro zdroje světla byla zvažována ve třech možnostech: primitivní volné spojení pomocí izolovaných drátů, nepájivé pole a deska s plošnými spoji. Dráty byly



zamítnuty jako nevhodné pro realizaci, nepájivé pole bylo zhodnoceno jako prakticky nejlepší varianta pro svou jednoduchost, bohužel však nebylo možné jej použít, protože do dostupného pole nebylo prostorově možno vložit vedle sebe obě LED matice. Bylo tedy rozhodnuto vyrobit vlastní desku s plošnými spoji. Návrh desky probíhal ve volně dostupném návrhovém programu KiCad ([www.kicad-pcb.org](http://www.kicad-pcb.org)). Navržena byla jednovrstvá deska o rozměrech 177 x 75 mm s odpovídajícím zapojením.



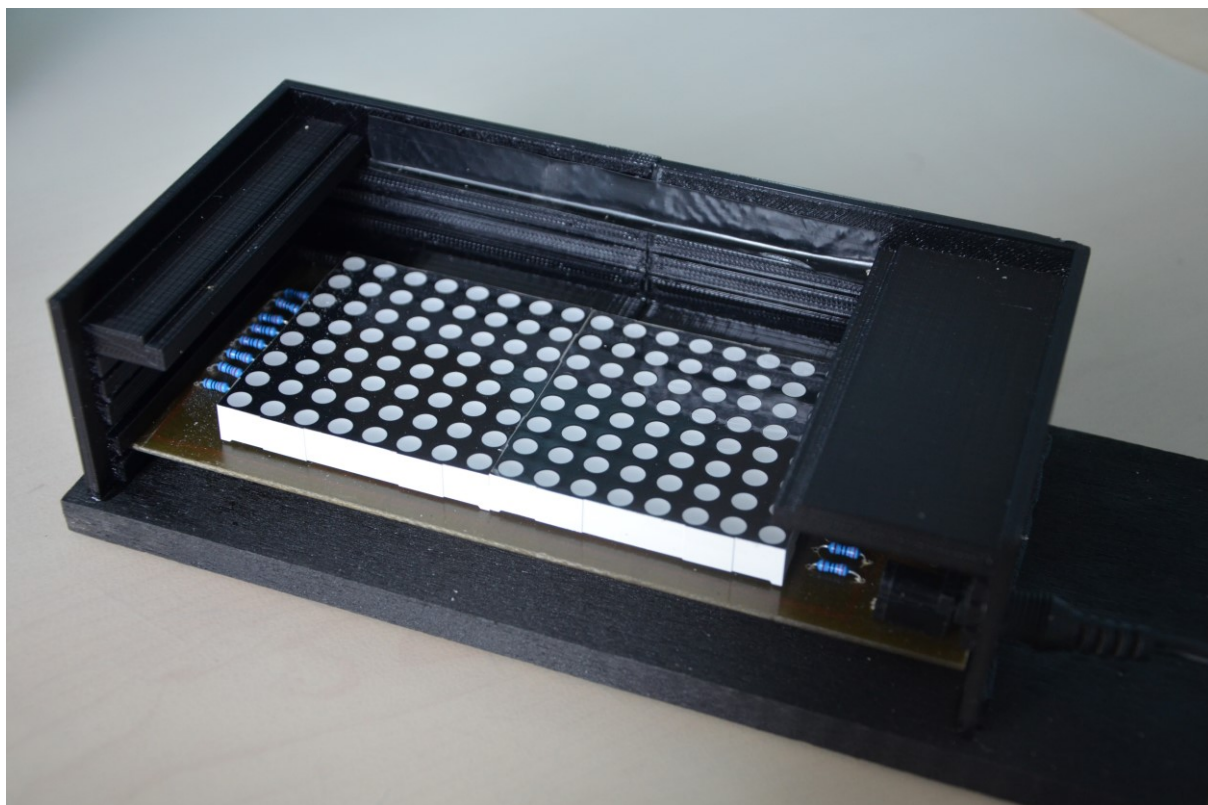
**Obrázek 26: Leptání DPS v lázni chloridu železitého**

Samotná deska cuprexitu byla nejprve oříznuta na požadovaný rozměr a opilována. K přenosu návrhu na cuprexit byla vybrána nažehlovací metoda. Návrh desky byl pomocí laserové tiskárny vytištěn na speciální fólii pro přenos toneru na DPS. Potištěná folie je následně nažehlena na cuprexit. Nedokonalosti v přenosu toneru byly opraveny pomocí lihového fixu, jehož krycí vlastnosti jsou také dostatečné. Potištěný cuprexit byl přibližně na hodinu ponořen do leptací lázně – 40% roztoku chloridu železitého (viz obr. 26). Po vytažení zůstala měď na desce pouze v žádaných místech, pokrytých krycím tonerem. Dále byly v potřebných místech ručně vyvrtány otvory pro součástky. Použit byl 1mm vrták a ruční elektrická vrtačka. Při pájení bylo třeba věnovat zvýšenou pozornost zejména pinům LED matic, které jsou velmi blízko u sebe. Po kompletaci byla deska osazená LED maticemi, konektorem a součástkami vsunuta do připravených lišt pod difuzory. Desku lze držet napájenou i při sejmutí krytu.

### **4.1.3 Napájení**

Napájení systému, respektive LED polí, lze v zásadě řešit dvěma standardními jednoduchými způsoby, a to pomocí galvanických článků nebo připojením k elektrické síti přes adaptér na nižší stejnosměrné napětí. Obě tyto možnosti jsou v řešení zakomponovány.

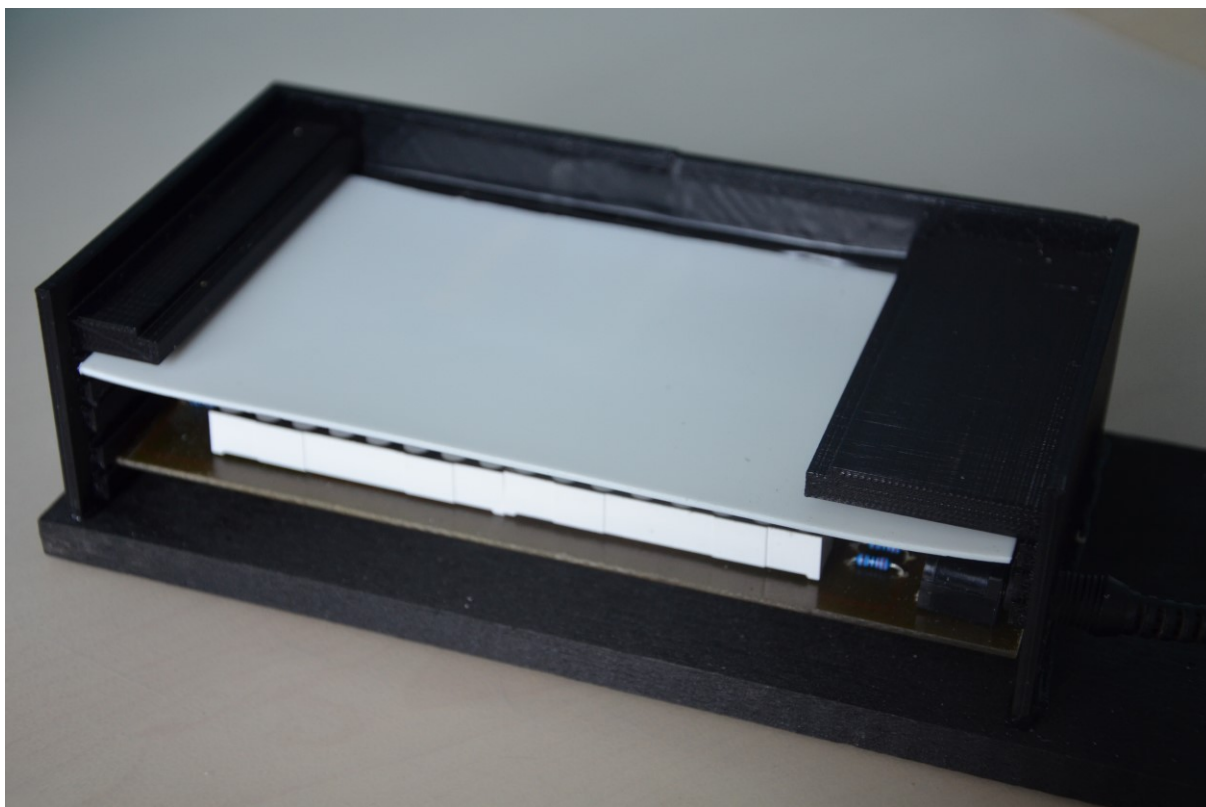
Na desce s plošnými spoji je napájen souosý DC konektor. Výstup adaptéru nebo článku musí tedy také obsahovat odpovídající konektor. Zde uvedená realizace je napájena buďto 9V článkem s konektorovým adaptérem – článkové elektrody na DC konektor, nebo 9V síťovým adaptérem, opět s výstupním souosým DC konektorem. Galvanický článek (popř. články) je uložen v malém boxu. Přístup výstupního kabelu síťového adaptéru je řešen pomocí podlouhlého výřezu ve stěně malého boxu (viz obr. 27). Samotný přístup ke konektoru na DPS je proveden pomocí malého otvoru mezi malým a velkým boxem. Po spojení napájecích konektorů, ať již z článku nebo z adaptéru, je možno malý box uzavřít krytkou. Mezi adaptér a konektor je vložen spínač, umožňující pohodlně zapínat a vypínat LED pro měření.



Obrázek 27: Hotová DPS s osvětlovací jednotkou, vsazená do lištové konstrukce

#### 4.1.4 Difuzor

Protože bylo zvoleno řešení s dvěma LED panely místo jednotlivých LED po každou jamkou (náročné na realizaci), a tudíž rozmístění jednotlivých LED nekorresponduje s rozmístěním jamek na destičce, je nutno zajistit homogenitu osvětlení celé destičky. Právě tento úkol plní tenký plochý difuzor, nacházející se v prostoru mezi DPS a samotnou mikrotitrační destičkou se vzorky (viz obr. 28).



**Obrázek 28: Lištová konstrukce se zasunutou osvětlovací jednotkou a difuzorem**

Ačkoliv existují různé difuzory z různých materiálů s vysokou kvalitou, vzhledem k finančnímu omezení je pro účely této práce využít pruh HDPE (High density polyethylene - Polyethylen s vysokou hustotou), vyříznutý z potravinového obalu. Tento pruh je vložen do vodících lišt ve velkém boxu.

Výhodou HDPE je bezpochyby jeho snadná dostupnost a zpracovatelnost, nízká cena a pro účely této práce dostatečná homogenizace procházejícího světla za určitých. Nevýhodou je pak útlum procházejícího světla (toto se však vzhledem k malé měřicí vzdálenosti ukázalo jako nepodstatné) a zároveň tvarová nestálost. Vyříznutý pruh má vzhledem ke svému původu v potravinovém obalu tendenci se jemně kroutit, vracet se do svého původního tvaru a vytvářet tak odchylky ve vzdálenostech LED - difuzor. Toto je jeden z hlavních důvodů nutnosti korekčních mechanismů při měření.

Pro určení vhodné vzdálenosti mezi LED panely a difuzorem, při které bude úroveň homogenizace prošlého světla dostatečná, byl proveden jednoduchý experiment. Nad svítící světlenou jednotku byly postupně do kartonového držáku vkládány difuzory s krokem o velikosti 0.5 cm. Postupně se ověřovala homogenita ve výšce 0 cm (difuzor položen přímo na LED panelech), 0.5 cm, 1 cm, 1.5 cm a 2 cm. Pro všechny úrovně byl pořízen snímek mobilním telefonem v temné místnosti a bez blesku. Pouhým pohledem však bylo zřejmé, že

nelze mít difuzor položen přímo na panelech, při výšce 0.5 cm však již byla difuze velmi zřetelná a při výšce 1 cm nad panely budila difuze dojem homogenity osvětlení. Pro další vyhodnocení byl vytvořen jednoduchý skript v Matlabu, jemuž byly vzhledem k předchozímu předloženy pouze snímky 0 cm, 0.5 cm, 1 cm a 1.5 cm. Předkládání posledního snímku bylo vyhodnoceno jako přebytečné. Analýza skriptem je založena na dvou jednoduchých metodách, a to zhodnocení rozptylu hodnot pixelů v modrých kanálech obrazů pomocí funkce *var()* a zhodnocení homogenity plochy ve funkcích *imagesc()* a *mesh()*. Na základě těchto analýz bylo rozhodnuto používat difuzory od 1 cm výše. Hodnoty rozptylu byly velmi malé (0.000 - zaokrouhlo na čtvrtém desetinném místě) a hodnoty pixelů dostatečně ploché.

#### 4.1.5 Mikrotitrační destička

Při vývoji byl brán zřetel na úmysl použít zařízení k měření koncentrace kortizolu ze slin pomocí metody ELISA. Vzhledem k tomu jsou například jako zdroj světla použity modré LED, neboť látky použité pro analýzu absorbují v modré části spektra. Protože se ale mikrotitrační destičky a reagenty pro ELISA vyznačují vyšší finanční náročností a horší dostupností, bylo rozhodnuto použít pro účely této práce jako testovací nosič vzorků pouze obyčejnou mikrotitrační destičku, bez chemické úpravy povrchu. Jako testovací vzorek byly místo ELISA reagentů a slin použity ředěné roztoky červeného inkoustu.

Použitá destička je standardizovaná 96jamková mikrotitrační destička značky TPP, o rozměrech 128 x 86 mm. Pracovní objem jedné jamky činí dle specifikace 0.34 ml. Další údaje jsou uvedeny v příložené dokumentaci [doc 1].



Obrázek 29: Standardní mikrotitrační destička, 96jamková, propagační foto výrobce TPP



Jako základ testovacího vzorku posloužil obyčejný červený inkoust, běžně dostupný v papírnictví. Z tohoto inkoustu byl ředěním destilovanou vodou experimentálně připraven roztok, u něž bylo empiricky ověřeno, že útlum procházejícího modrého světla dosahuje prakticky 100 %. Koncentrace tohoto roztoku není stanovena, slouží pouze jako referenční základní roztok. Dalším ředěním referenčního roztoku byla připravena sada několika vzorků, jejichž koncentrace je udávána jako odpovídající zlomek vůči referenčnímu roztoku. Tyto roztoky jsou uvedeny v tabulce Tab.1. Roztok A se však ukázal být zřejmě již mimo rozsah systému, neboť produkoval identický signál s referenčním roztokem.

**Tabulka 1 Koncentrace kalibračních roztoků**

Roztok	Korekční	Referenční (R)	A	B	C	D	E	F	G
Koncentrace	0	1	1/2	1/5	1/8	1/10	1/15	1/20	1/40

## **4.2 Software**

### **4.2.1 Matlab**

Hlavním vývojovým nástrojem je programové prostředí Matlab. Mezi hlavní přednosti ve vztahu k této práci patří silné nástroje pro zpracování obrazu a provázanost s dosavadní výukou.

Pro účely této práce byla pořízena a nainstalována trialová verze prostředí Matlab ve verzi 2016b a zřízen účet na MathWorks.com. To umožnilo využít některé funkce z nové verze, hlavně však propojení Matlab Mobile s cloudem MathWorks a přístup ke Cloud Storage pro ukládání souborů.

### **4.2.2 Matlab mobile**

Matlab Mobile je mobilní aplikací pro chytré telefony od společnosti MathWorks, Inc, vývojářů prostředí Matlab. Lze ji stáhnout a instalovat na operační systémy Android i iOS.

Aplikace umožňuje spustit na mobilním zařízení některé části Matlabu, zejména Command Window a prohlížení grafů a obrazů. Pokročilejší funkce a Editor nejsou přítomny. Samotná aplikace žádné výpočty ani úlohy neprovádí, využívá výpočetní sílu vzdálených zdrojů – aplikaci je nutné přes internet propojit buď s plnou verzí Matlabu na běžném PC, nebo ji připojit k MathWorks Cloud.

Při spojení s cloudem pak aplikace pracuje s výpočetními zdroji MathWorks a se soubory nahranými v Cloud Storage. Pokud má uživatel zřízen účet u MathWorks, je mu poskytnut úložný prostor 500 MB, což je pro účely této práce více než postačující.

Výhoda Matlab Mobile spojeného s cloudem spočívá jednoznačně v absenci nutnosti mít zapnutý vlastní počítač, avšak také v dostupnosti většiny toolboxů s nejrůznějšími funkcemi, které na běžném PC nemusí mít uživatel při k dispozici. Zřetelným faktem je také vyšší výpočetní síla cloudu a s tím spojené rychlejší provádění komplikovanějších funkcí (např. funkce *imregister* pro registraci obrazů). Ovšem tato výhoda je často smazána jiným neduhem, jak bude uvedeno dále.

Stěžejní nevýhodou, a zároveň výraznou komplikací pro tuto práci, je nemožnost nahrávat jakékoliv soubory do Cloud Storage přímo z mobilního zařízení. K tomu je nutné klasické PC s webovým prohlížečem. Tato možnost zásadně komplikuje postup při měření v rámci této práce, neboť neumožňuje nahrávat vyfocené snímky na cloud přímo. Toto negativum bylo kompenzováno za využití jiných cloudových služeb, přístupných z mobilních zařízení přes internetové připojení, zejména se jedná o Google Drive a Dropbox. Obě tyto služby lze při měření využít, a lze mezi nimi přepínat.

Dalším negativem aplikace je absence zobrazení prostoru s proměnnými Workspace. Proměnné lze jej vypsát do Command Window pomocí příkazů, nelze jej však zobrazit trvale. Toto sice opět komplikuje práci, nejedná se však o závažný nedostatek.

Tím je naopak omezení času, po který je aplikace ochotna vykonávat spuštěné příkazy. At je již uživatel připojen ke cloudu nebo ke svému PC, po 50 sekundách dojde v aplikaci k přerušení činnosti. V operačním systému Android je toto provázeno hláškou oznamující, že aplikace nepodporuje operace trvající déle než 50 s. V systému iOS dojde k odpojení uživatele od účtu s doprovodným chybovým hlášením a selhání spojení a nutnosti opakovat akce. Po opětovném připojení k účtu se však v některých případech zobrazují správné výsledky prováděné operace. Nebyla však prokázána žádná závislost vedoucí úspěšným či neúspěšným proběhnutím. Někdy vedlo vymazání inkriminovaných proměnných před opětovným spuštěním funkce k jejímu úspěšnému vykonání (samozřejmě s odpojením v mezikroku), mohlo se však stále jednat o náhodu. Tato vlastnost systému nuceně vedla k takovým úpravám algoritmů, aby se výpočetní čas snížil pod tuto hranici.

Nutné je také zmínit časté výpadky ve spojení po spuštění různých funkcí. Při přepínání mezi aplikacemi pak někdy dochází k opakovanému připojování aplikace ke cloudu. Objevuje se také zamrzání při pokusu o spojení. Nejedná se sice o kritické problémy, výrazně to však obtěžuje nebo přímo znemožňuje práci. Za velmi závažné je ale nutno považovat vznikání, z uživatelského hlediska, nesmyslných chyb, bez vazby na prováděnou činnost. Stává se tak například, že jedna a tatáž funkce proběhne na běžném Matlabu na PC

vpořádku, a ta samá funkce se stejnými vstupními parametry ohlásí při spuštění chybu, ovšem bez logické vazby na činnost, kterou má provést. Toto může mít svou vnitřní logiku a podstatu v rozdílech mezi systémy, běžnému uživateli zvenčí toto však není zřejmé a z jeho pohledu se tak objevují nahodilé chyby.

Celkově lze konstatovat, že Matlab Mobile je nepochybně užitečným nástrojem, který umí za jistých okolností přenést analytickou sílu Matlabu i na mobilní zařízení, poskytující jim značné schopnosti např. pro zpracování obrazů či signálů, avšak pro plné nebo pohodlné využití by potřeboval rozšíření stávajících možností a schopností a především značné vylepšení stability spojení! (pozn.: spojení s Matlabem běžícím na PC nebylo testováno, neboť nebylo pro účely této práce využíváno) Prozatím nelze spolupráci s tímto nástrojem hodnotit kladně.

#### **4.2.3 Google Drive a Dropbox**

Jako mezikrok v nahrávání obrazových souborů do Cloud Storage v případě využití cloudu pro spouštění algoritmů slouží webová datová uložště. Pro účely této práce bylo využito služeb dvou z těchto uložšť, a to konkrétně Google Drive ([www.google.com/drive](http://www.google.com/drive)) a Dropbox ([www.dropbox.com](http://www.dropbox.com)). Obě tyto služby nabízejí bezplatné verze a mobilní aplikace jak pro Android, tak pro iOS. Dropbox navíc udržuje stejnou URL adresu souboru, i pokud je přepisován, ale nemění se jeho jméno.

#### **4.2.4 Vývoj vlastních řešení**

V souladu s cíli a postupy této práce bylo Matlabu vytvořeno několik algoritmů realizujících dílčí kroky.

Prvním je skript *homogenita.m*. Tento skript umožňuje velmi jednoduchými metodami vyhodnotit homogenitu světla prošlého skrz difuzor v různých vzdálenostech nad LED maticemi. Použity jsou příkazy *var()* pro zjištění rozptylu, a několik grafických výstupů funkcí *mesh()*, *imagesc()* a *imhist()*, umožňujících pozorovat rozložení jasu v obraze. Pro výšku 1 cm a 1.5 cm jsou už hodnoty rozptylu jasu na čtvrtém desetinném místě zaokrouhleny na nulu.

Součástí měření koncentrací v jamkách mikrotitrační destičky je několik samostatných funkcí.

#### ***Kalibrace***

První části kódů pro kalibraci tvoří blok pro načítání předkládaných snímků. Vstupními argumenty jsou adresy kalibračních snímků, zdroj odkud pochází, známé koncentrace a typ požadované kalibrace. Protože snímky jsou načítány přímo z cloudových uložšť, jsou jako argumenty funkce *imread()* předkládány URL adresy snímků.

Ty je nutné pro spuštění funkce vložit do pole *adresy*. Tyto adresy však nejsou v původním stavu, v jakém jsou získány z uložišť při sdílení, pro Matlab použitelné. Většinou totiž odkazují na interní prohlížeče daného uložiště a Matlab je nerozezná jako obrázek. Je tedy nutné v URL adresách před vložením detekovat specifické sekvence a nahradit je jinými znaky, díky čemuž se adresa změní v odkaz pro stahování. V takovéto formě je už odkazovaný obrázek pro Matlab zpracovatelný a provede se úspěšné načtení.

```
switch zdroj
    case 'dr' %dropbox
        url = strrep(url, 'dl=0', 'dl=1');
    case 'gd' %google drive
        url = strrep(url, 'file/d/', 'open?id=');
        url = strrep(url, 'open?', 'uc?export=download&');
        url = strrep(url, '/view?usp=drivesdk', '');
    otherwise
        error('Zadat správný zdroj')
end
```

V argumentu *zdroj* vytvořených funkcí je nutné zvolit, odkud je daný snímek nahráván. Dle toho je pak adresa URL odpovídajícím způsobem upravena. Úpravy pro Google Drive jsou mírně složitější, neboť jeho mobilní aplikace upravuje adresu ke sdílení souborů jiným způsobem než pro webový prohlížeč na PC. Dropbox zachovává stejný způsob adresy jak pro PC, tak pro mobilní aplikace. Alternativně jsou v komentářích ponechány řádky pro načtení snímků přímo z PC.

Dále je provedena extrakce modrého kanálu RGB a zmenšení obrázků funkcí `imresize()`, pokud jsou příliš velké. Tímto se šetří čas navazujícím funkcím provádějícím registraci obrazu. Funkce pro registraci, `imregister()`, se snaží odpovídajícím způsobem zarovnat k sobě dva podobné (stejně) snímky, jeden se bere jako fixní, druhý pohyblivý. Registrace se provádí na základě podobnosti. Pro funkci je důležité v předchozím kroku definovat konfiguraci, v jaké bude pracovat. Toto provádí funkce `imregconfig()`. Vstupním argumentem je zde multimodalita, neboť ačkoliv snímky obvykle pocházejí ze stejného přístroje, mezi jednotlivými snímky může telefon provést značné zásahy (bude rozebráno později), proto byl argument ponechán v tomto stavu. Vykonání funkcí `imregister()` je časově náročné a délka jejího běhu ohrožuje vykonání celé funkce vzhledem k 50sekundovému limitu, který zavádí Matlab Mobile (proto bylo v některých případech přistoupeno k provedení kalibrace na PC a nahrání jejích výsledků ve formě proměnných na Cloud Storage). Dále se provede detekce a rozměření destičky pomocí vytvořené funkce **hrany**. Tato funkce hledá hrany a rohy destičky pomocí Cannyho hranového detektoru a Houghovy transformace. Hned na úvod si funkce oddělí levou polovinu snímku, v níž bude nadále pracovat- ROI. Tato oblast se binarizuje a mediánovým filtrem pročistí od části šumu vzniklého při binarizaci. Následně je aplikovat hranový detektor (Canny) a na hranovou

reprezentaci pak Houghova transformace. V Houghově prostoru pak hledáme nejsilnější vrcholy a jim odpovídajícím dlouhé přímky. Protože se v obraze velmi pravděpodobně nachází více velmi podobných přímek, je třeba zvolit za okrajové hrany ty správné. Zde je uplatněn předpoklad, že byla učiněna snaha vyfotit destičku co nejvíce zarovnanou s okraji snímku, a proto bude případná odchylka malá. Ve funkci tedy vyhledáme vertikály a horizontály (přímky s úhlem  $\theta$  okolo  $0^\circ$  a  $90^\circ$  v absolutní hodnotě), s tolerancí  $10^\circ$ . Lze rozumně předpokládat, že při správné binarizaci a hranové detekci bude ve skupině vertikál s nejsilnější odezvou reprezentovat vnější levý okraj právě taková přímka, která bude mít v absolutní hodnotě nejmenší vzdálenost  $\rho$ . Analogicky je stanoven předpoklad pro horní a spodní okraj předpoklad o nejmenší a největší vzdálenosti  $\rho$  ve skupině horizontál.

```
image = image(:,1:size(image,2)/2); % ROI - levá strana snímku

bw = imbinarize(image, 'adaptive', 'Sensitivity', 0.55);

bw = medfilt2(bw);

hrany1 = edge(bw, 'Canny');

[H, theta, rho] = hough(hrany1, 'RhoResolution', 1, 'ThetaResolution', 1);
P = houghpeaks(H, 6, 'threshold', ceil(0.3*max(H(:)))));
lines =
houghlines(hrany1, theta, rho, P, 'MinLength', 200, 'FillGap', 500);

L1 = lines(abs([lines.theta]) >= (max(abs([lines.theta]))-10));
%horizontály ... v rozsahu 10°
L2 = lines(abs([lines.theta]) <= (min(abs([lines.theta]))+10));
%vertikály ... v rozsahu 10°

horni_lajna = L1(abs([L1.rho]) == min(abs([L1.rho]))); horni_lajna =
horni_lajna(1); %první horizontála = horní hrana
dolni_lajna = L1(abs([L1.rho]) == max(abs([L1.rho]))); dolni_lajna =
dolni_lajna(1); %poslední horizontála = dolní hrana
bocni_lajna = L2(abs([L2.rho]) == min(abs([L2.rho]))); bocni_lajna =
bocni_lajna(1); %první vertikála = boční hrana
```

Dále následuje výpočet průsečíků detekovaných hran, ty indikují přibližnou polohu levého horního a dolního rohu. Běžně by pro tento úkol byla užita funkce `polyxpoly`, ta však nebyla v užití verzi Matlabu k dispozici (chybějící toolbox) a proto byl použit primitivnější manuální způsob. Dále následuje vyobrazení se zvýrazněnými hranami a rohovými body. Pokud detekované rohy a hrany dostatečně neodpovídají realitě, je třeba měření přerušit, upravit podmínky snímání a spustit znovu. Výstupem funkce **hrany** jsou informace o referenčních bodech, které nadřazená funkce kalibrace dále využije.

Na základě znalosti úhlu levé hrany může být provedena rotace snímku tak, aby hrany destičky byly souběžné s okraji snímků. Následuje rozměření destičky a určení souřadnic, ze kterých se budou číst hodnoty v jamkách. Zde je použita také funkce `imfindcircles()` pro nalezení první jamky vlevo nahoře, od ní se dále odvozují souřadnice pro čtení hodnot v jamkách. Pro samotné určení vzdáleností mezi jamkami bylo krom technické specifikace destičky použito lehké empirické korekce, neboť snímky vzhledem k malé akviziční vzdálenosti podléhají mírné distorzi. Bohužel tak avizovaná vzdálenost 9 mm mezi středy jamek neplatí v obraze mezi všemi jamkami. Dále také nejsou u krajních jamek k dispozici středy jejich dna, neboť jejich snímání probíhá pod úhlem okolo 30°, proto byly vzdálenosti empiricky upraveny tak, aby souřadnice pro čtení hodnot ležely vždy alespoň v nějaké části dna.

Samotné zjištění hodnot v jamkách probíhá na základě vyhodnocení mediánu z kruhového okolí vypočítaného pixelu. Medián byl zvolen proto, aby byla hodnota jasu jamky méně náchylná k ovlivnění nevalidními hodnotami vzniklými v jako důsledky optických jevů.

```
for k = 1:pocet_snimku
    values_vector = zeros(1,96);
    for i = 1:96
        flek = snimky{k}(y(i)-okoli : y(i)+okoli , x(i)-okoli :
            x(i)+okoli);
        %netvarované okolí zkoumaného pixelu - plná matice
        pom = flek .* double(SE.Neighborhood); %z plné matice
        bereme pouze část ve tvaru disku
        values_vector(i) = median(median(pom(pom ~=0 )));
        %mediánová hodnota z disku (vynechání nul - nepřispívají
        do okolí a snižovaly by medián)
    end
    jamky_hodnoty(:, :, k) = reshape(values_vector,12,8)';
end
```

Po změření hodnot v jamkách se otevírají dvě cesty. Byly zpracovány dvě varianty výpočtu kalibrační křivky pro budoucí měření. Typ kalibrace vybere uživatel v argumentu funkce. Metoda **,all'** zpracovává kalibrační křivky pro každou jamku na destičce. Metoda **,one'** využívá výpočtu korekčních faktorů pro jednotlivé jamky a následné sestavení kalibrační křivky pro celou destičku. Více o účelech korekčních faktorů bude popsáno dále.

Po vytvoření a sestavení korekčních faktorů jsou tyto aplikovány na naměřené hodnoty a uloženy souběžně s nekorigovanými hodnotami. V případě, že uživatel zvolil variantu **,all'**, jsou vypočítány hodnoty absorbance pro každou jamku na destičce jako záporný dekadický logaritmus transmitance (viz kapitola 2.2), zde tedy poměru hodnoty jamky s obsahem zkoumané látky a hodnoty jamky s nulovou koncentrací zkoumané látky (blank). Z hodnot absorbance pro každou jamku při různých koncentracích je pomocí funkce

*polyfit()* vypočtena kalibrační křivka každé jamky. Výpočtem absorbance dojde k linearizaci vztahu vůči koncentraci a výstupem je lineární kalibrační křivka s koeficienty  $k$  a  $q$ .

Dále je výstupem kalibrační funkce je kalibrační snímek s nulovou koncentrací zkoumaného vzorku (blank) ve formě proměnné *im\_cor*; pole *prostor*, obsahující proměnné pro lokalizaci jamek v obraze po registraci snímků; koeficienty korekční funkce pro výpočet korekčních faktorů (viz dále) a proměnná  $I_0$ , která, dle zvolené varianty, obsahuje buď původní jasové hodnoty v jamkách blanku, nebo medián korigovaných hodnot blanku. Vyjmenované proměnné jsou také vstupními argumenty pro měřicí funkci.

## Měření

Funkce pro měření pracuje ze začátku podobně jako kalibrace. Zahajuje se prohlížením a pozměněním předkládané URL adresy. Následuje načtení obrázku, extrakce modrého kanálu RGB a zmenšení, pokud je snímek velký. Funkce *imregister()* provede registraci měřeného snímku s korekčním, poté jsou načteny atributy z proměnné *prostor*, potřebné pro čtení hodnot z jamek – souřadnice, velikost a tvar disku. Čtení hodnot je provedeno stejně jako u kalibrace. Následuje *switch* konstrukce, rozdělující analýzu neznámého vzorku do dvou způsobů podle argumentu, který je zadán při spuštění funkce. Komplementárně k metodám kalibrace All a One jsou z kalibračních křivek, příslušných dané metodě, vypočteny výsledné koncentrace. Výsledky jsou vyneseny do přehledného grafického pole s vyobrazenými hodnotami a odpovídajícím doprovodným podbarvením.

```
for h = 1:8
    for g = 1:12
        kf = korekcni_funkce{h,g};
        jamky_hodnoty_cor_m(h,g) = jamky_hodnoty_m(h,g) *
            kf(1)*exp(kf(2)*jamky_hodnoty_m(h,g));
    end
end
for a = 1:8
    for b = 1:12
        absorbance_m2(a,b)=log10(jamky_hodnoty_cor_m(a,b)/I0 );
    end
end
for h = 1:8
    for g = 1:12
        C(h,g) =(absorbance_m2(h,g) - kalibracni_krivka2(2)) /
            kalibracni_krivka2(1);
        C(find(absorbance_m2 <=0)) = 0;
    end
end
```

### 4.3 Postup práce s analytickým systémem

Jako první krok je potřeba provést kalibraci. Je nutné si tedy postupně připravit adekvátní počet destiček se všemi jamkami naplněnými vzorky se stejnou koncentrací zkoumané látky, a pokud možno v co nejpřesnějších objemech (alternativně lze používat jednu destičku jako při testování, ovšem je to zdlouhavé). Odklopíme velký kryt a první připravenou destičku vložíme na její místo, případně přiložíme pěnový pruh pro zamezení pronikání světla do snímacího prostoru okolo destičky. Zaklopíme velký kryt, připojíme kabel adaptéru napájení a nachystáme telefon na vrchní stranu krytu, tak aby fotoaparát směřoval skrz průzor do snímacího prostoru. Je třeba mít na telefonu nastavené pevné hodnoty parametrů focení, které budou dále respektovány. Spínačem rozsvítíme LED panely. Vycentrujeme telefon tak, aby zabíral celou jamku, s důrazem na dostatečnou viditelnost levé horní a dolní hrany. Vyfotíme potřebný snímek/snímky a vyměňujeme destičky se vzorky. Po odfočení opět vypneme LED panely, aby se napěťový stabilizátor zbytečně nepřehříval.

Pro práci se systémem je nutné mít mobilní telefon připojen k datové síti. Nahrajeme kalibrační snímky na jedno ze dvou povolených datových uložišť, nebo stáhneme snímky do PC s prostředím Matlab. Alternativně lze adresy URL vložit do proměnné *adresy* a pokusit se spustit kalibraci přímo na telefonu, velmi pravděpodobně však Matlab operaci ukončí kvůli dlouhému trvání. V PC tedy spustíme nachystanou kalibrační funkci **shieldcalibr** a předložíme jí URL adresy snímků nebo jejich lokace na PC, dále zvolíme zdroj URL adres (gd – google drive; db - dropbox), koncentrace měřených standardů a vybereme typ kalibrace (All / One). Funkce provede výpočet zvolených kalibračních křivek, operace může trvat delší dobu kvůli několika operacím registrace obrazu. Pokud se kalibrace provádí na PC, je nyní nutné její výstupy nahrát do MathWorks Cloud, společně s měřicí funkcí **shieldmeasure**.

Dále si připravíme měřený vzorek a stejně jako při kalibraci jej vyfotíme a nahrajeme na jedno z uložišť. Adresu si zkopírujeme, zapneme Matlab Mobile, přihlásíme se do Cloudu (alternativně spustíme spojení mezi mobilní aplikací a PC). Po připojení by měly v Cloud Storage čekat potřebné proměnné a měřicí funkce. Předložíme funkci **shieldmeasure** zkopírovanou URL adresu a ostatní potřebné argumenty. Jako typ měření vybereme stejnou metodu jako při kalibraci. po spuštění aplikace čekáme na výsledek, měla by se zobrazit matice koncentrací v Command Window a objevit se okno s mapou koncentrací na destičce.

Pokud systém nedává rozumně zdůvodnitelné výsledky, lze opakovat měření. Mohla například nekorektně proběhnout detekce hran destičky pomocí Houghovy transformace. (Pozn. autora: defaultní nastavení hodnot není jediné možné, někdy lze dostat lepší výsledky například změnou citlivosti binarizace nebo změnou velikosti změřeného milimetru.).



Mezi jednotlivými měřeními je nutno držet stejná fotografická nastavení a ideálně i stejnou polohu. V případě nedodržení může za určitých okolností pomoci registrace snímků.

Je nutné správně pipetovat vzorky a korektně namíchat koncentrace vzorků. Vzhledem k malému objemu jamek a pozorování krajních jamek pod relativně velkým úhlem jsou změřené jasové hodnoty některých jamek zvláště citlivé na nesprávnou přípravu vzorků.

#### **4.4 Realizovaný vývoj**

Přestože realizované řešení v zásadě odpovídá teoretickému návrhu, bylo nutné v zájmu optimalizace podniknout několik kroků odlišným směrem. Optimalizováno bylo především vzhledem k výsledné ceně řešení, náročnosti sestavení a parametrům osvětlení vzorků. Kritickou se pak ukázala optimalizace kalibračních a měřících algoritmů vzhledem k podmínkám snímání.

Jak už bylo psáno dříve, z hlediska konstrukce zařízení byla většina částí místo 3D tisku zaměněna za balsaové dřevo. Toto bylo učiněno především pro ušetření tiskového času, také tím byla získána možnost částečných úprav zařízení i po kompletaci, neboť dřevo je stále možné ořezat, případně rychle dolepit nové kusy. Tištěny zůstaly pouze lištová konstrukce pro ustájení osvětlovací jednotky, difuzorů a destičky, a malý kryt pro krytí napájecího vstupu. Velký kryt však tímto krokem ztratil na své robustnosti a je nutné s ním nakládat se zvýšenou opatrností.

Dále bylo rozhodnuto o využití převážně telefonu LG G2, neboť u S3 Neo se projevila výraznější distorze při fotografování ve formátu 4:3, při formátu 16:9 pak zorné pole telefonu nepojalo celou destičku. G2 tímto problémem netrpí.

Protože balsaové dřevo je nativně světle hnědé, zatímco tiskový plast PLA byl dodán v černé barvě a samotnou podstatou krytu je izolace vzorků od vnějšího světla, byl kryt nabarven černou sprejovou barvou pro minimalizaci vnitřních odrazů. Také se objevilo slabší pronikání světla z osvětlovací jednotky okolo vzorků na otevřené straně lištové konstrukce. Tento jev pak při rozměřování mátl hranový detektor, neboť po binarizaci osvětlená plocha splývala s hranou destičky. Při možnosti opravy návrhu by jistě bylo vhodnější doplnit horní plošky (nosiče destičky) ještě o tenkou lištu na otevřené straně. Vzhledem k neadekvátnosti opakování tisku kvůli tak malé závadě bylo toto vyřešeno přidáním tenkého černého pěnového pruhu, který pronikající světlo eliminoval.

Při prvotním pořizování snímků v hotovém zařízení bylo zjištěno, že intenzita světla prošlého přes difuzor i destičku způsobuje přesycení snímače telefonu. Na snímcích se tak objevoval rozsáhlá čistě bílá oblast, ve které docházelo k úplné ztrátě informace. Protože změny v nastavení fotoaparátu nevedly k dostatečnému zlepšení a výměna součástí v obvodu, vedoucí ke snížení svítivosti, by byla relativně složitější, bylo zvoleno jednoduše

přidat mezi LED matice a destičku další difuzory. Tím došlo ke snížení intenzity procházejícího světla a subjektivně také ke snížení nehomogenity prosvětlení (nebylo již objektivně měřeno) a to i přes fakt, že další difuzory zavádějí do systému opět další tvarové nerovnosti.

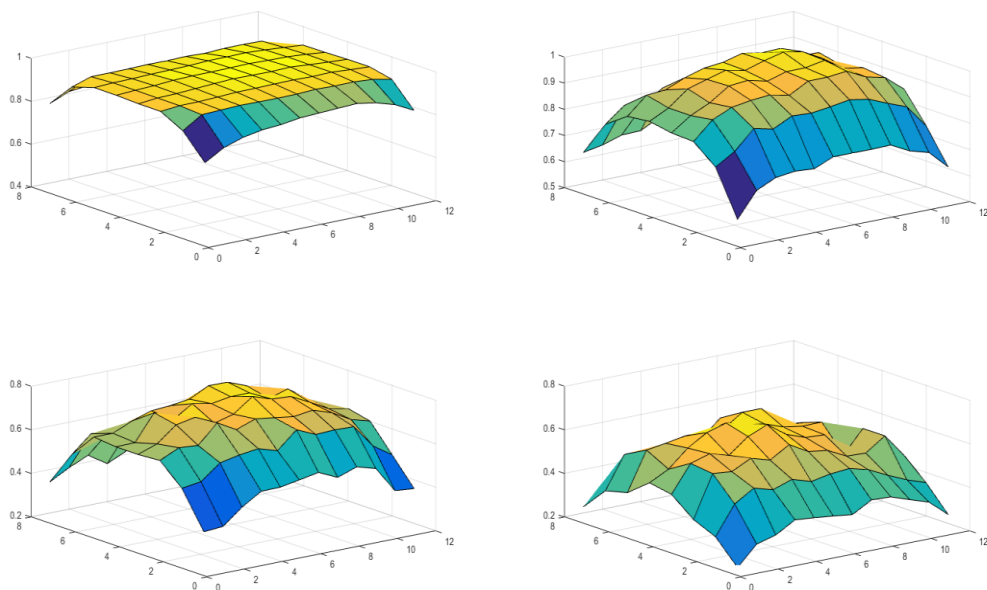
Bylo upuštěno od začlenění čočky před fotoaparát, neboť se ukázala jako nepotřebná.

Z hlediska softwarového došlo ke změně u výpočtu překrývání snímků. Původně byla aplikována metoda korelace, nicméně ta vzhledem ke značným odlišnostem mezi snímky, daným rozdílností koncentrací jamkách, nebyla úspěšná. Proto byla zvolena metoda registrace snímků pomocí funkce *imregister()*. Provedení této funkce však zabírá mnohem více času a ovlivňuje běh algoritmu.

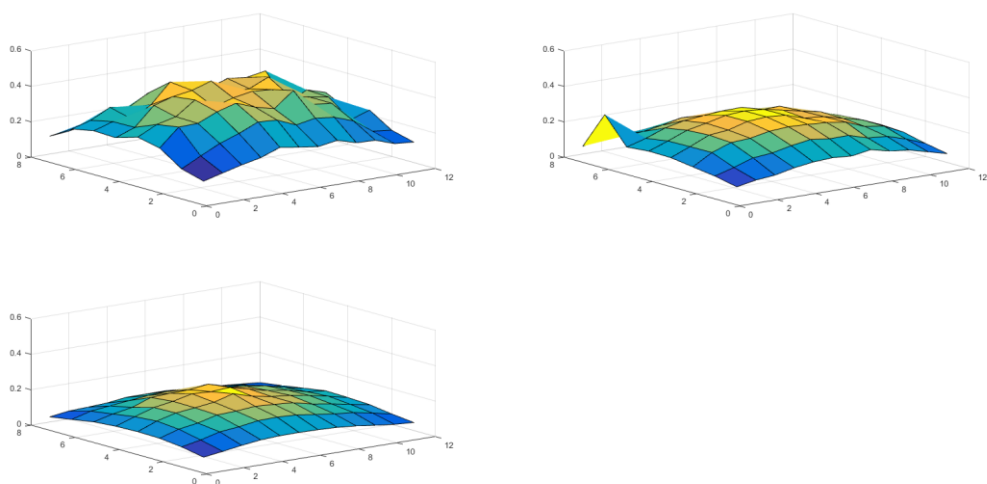
Nejzávažnější oblastí, která si vyžádala mnoho zásahů je však samotná akvizice snímků a která se také stala úskalím této práce, je korekce naměřených hodnot. V průběhu práce na vyhodnocovacích algoritmech bylo identifikováno několik více či méně závažných faktorů, které negativně působí na reálné hodnoty a zavádí tak do měření nežádoucí odchylky.

Prvním faktorem, který ovlivňuje naměřené jasové hodnoty v jednotlivých jamkách, je prostorové rozložení nehomogenity intenzity dopadajícího světla. Obr. 30, ukazuje prostorové rozložení naměřených hodnot u kalibračních snímků, kde jsou všechny jamky destičky naplněny vzorkem o stejné koncentraci. Když nyní pomineme nedokonalosti v plnění jamek, které mají nahodilý charakter, je zcela zřetelně vidět závislost naměřeného jasu na lokalitě, s hodnotami systematicky klesajícími směrem od středu ke stranám. Příčinou tohoto jevu je nerovnoměrné osvětlení vzorků LED panelu. Zatímco střední jamky jsou osvětlovány prakticky z celého svého okolí, krajní jamky, jsou osvětlovány pouze LED přímo pod sebou a okolními LED z jednoho kvadrantu. Nejvíce postiženy jsou logicky jamky v rozích destičky. Doplnujícím efektem je nesterjnoměrné vzdálenostní rozložení difuzorů mezi LED a destičkou v důsledku tvarových nedokonalostí difuzorů (je možno vidět, že směrem k levé straně je

systematický pokles znatelnější a maximálního jasu dosahují jamky spíše vpravo od středu).



**Obrázek 30: Grafy jasových hodnot v jamkách kalibračních snímků pro čtyři postupně stoupající koncentrace. Relativní rozsah osy Z činí 0.6**



**Obrázek 31: Grafy jasových hodnot v jamkách kalibračních snímků pro tři postupně stoupající koncentrace. Relativní rozsah osy Z činí 0.6**

Dále zde působí fakt, že destička je snímána z relativně malé vzdálenosti, a tak jsou krajní jamky pozorovány pod úhlem okolo  $30^\circ$ , což působí na délku dráhy, kterou procházející světlo urazí skrz vzorek. Prodloužením dráhy dojde k dalšímu útlumu. De facto se tedy uplatňuje i nehomogenita v množství vzorku v jednotlivých jamkách.

Důsledkem toho je, že jamky se stejnou koncentrací, které by měli poskytovat stejný signál, se výrazně liší naměřenými hodnotami v závislosti na svém umístění. Tento negativní jev bylo navrženo řešit pomocí dvou různorodých přístupů, již dříve vyjádřených v metodách kalibrace a měření All a One.

Metoda All zcela ignoruje rozdíly způsobené nehomogenitou, která v akvizici vzniká a místo toho naopak předpokládá, že nehomogenita bude stálá i mezi jednotlivými měřeními, což se jeví vzhledem ke konstrukci zařízení jako rozumný předpoklad (drážky a lišty jsou vyrobeny tak, aby destička se vzorky i velký kryt byly vždy ve stejné pozici). Za těchto okolností lze vypočítat absorbance pro každou jamku na destičce a na jejich základě stanovit kalibrační křivku pro každou jamku v případě kalibrace, nebo naopak vypočítat hodnotu koncentrace v každé jamce dle její kalibrační křivky v případě měření neznámých vzorků.

```
for a = 1:8
    for b = 1:12
        for c = 1:size(jamky_hodnoty,3)
            I0 = jamky_hodnoty(:, :, 1);
            absorbance(a,b,c) = -log10(jamky_hodnoty(a,b,c) /
                                         I0(a,b) );
        end
    end
end
kalibracni_krivky = {};
for k = 1:8
    for l = 1:12
        kalibracni_krivky{k,l} =
            polyfit(koncentrace, reshape(absorbance(k,l,:), 1, size(absorbance,3)), 1 );
    end
end
```

Metoda One naopak vnímá světelnou nehomogenitu v systému a má za cíl sestavit jednu kalibrační křivku pro celou destičku. K sestavení jedné kalibrační křivky potřebuje hodnoty absorbance destičky při různých koncentracích. Jenže jak už bylo řečeno, jednotlivé jamky jsou silně ovlivněny nehomogenitou, proto je před zápornou logaritmizací transmitance nutné vyrovnat hodnoty jednotlivých jamek tak, aby byly všechny reprezentovány jedinou hodnotou. Pro tento účel využije metoda One korekčních faktorů, což jsou individuální hodnoty pro každou jamku, kterými se hodnota dané jamky vynásobí, aby výsledek reprezentoval správnou hodnotu jasu, tedy takovou jako by se jasová nehomogenita neuplatňovala.

Postup je následující (viz kód pod odstavcem): v kalibračním snímku předpokládáme, že čtyři jamky D6 až E7 mají nejsprávnější možný přenos světla. Jsou umístěny uprostřed destičky a jsou tedy nejlépe osvětleny LED panely a jejich jasové hodnoty nejsou ovlivněny snímáním pod úhlem. Zjistíme průměr jejich hodnot (jamky mohou být ovlivněny

nehomogenitou difuzorů), ten poté bereme jako referenční hodnotu, kterou by ideálně měly vykazovat všechny jamky, pokud by nebyly pod vlivem rušivých jevů. Pro každou jamku následně provedeme dělení referenční hodnoty změřenou hodnotou dané jamky, čímž získáme její korekční faktor. Posledním řádkem si jen ověříme, že faktory byly správně spočteny.

```
for i = 1:pocet_snimku
    referencni_jamky = jamky_hodnoty(4:5,6:7,i);
    referencni_hodnota = mean(referencni_jamky(:));
    korekcni_faktory(:, :, i) = referencni_hodnota ./ jamky_hodnoty(:, :, i);

    values_cor(:, :, i) = jamky_hodnoty(:, :, i) .* korekcni_faktory(:, :, i);
end
```

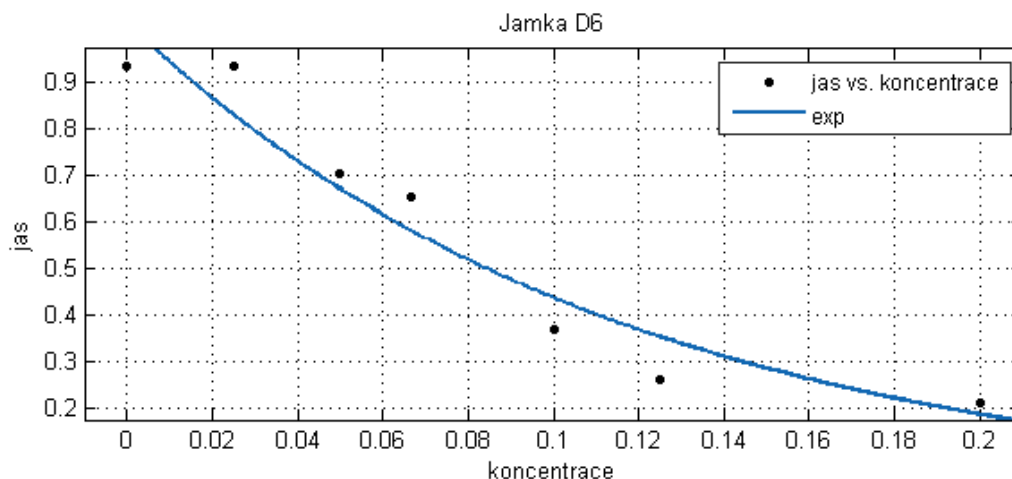
Aplikací korekčních faktorů by tedy teoreticky mělo dojít k vyrovnaní nehomogenit a naměřené jasové hodnoty by měly odpovídat reálnému stavu. Bohužel tomu tak není. Jak si lze povšimnout na obrázcích obr. 30, 31, míra nehomogenity je také koncentračně / jasově závislá. U vzorků s nižší koncentrací – vyšším jasnem se výše zmíněná nehomogenita uplatňuje více, než u vzorků s vyšší koncentrací zkoumané látky – nižším jasnem. Onen „želví krunýř“, který rozložení nehomogenity připomíná, je značně vypouklejší u kalibračních snímků pro nízké koncentrace. Mění se tedy špičatost plochy. Zde už příčina není tak zřejmá. Lze však důvodně předpokládat, že za tímto jevem stojí exponenciální závislost transmitance na koncentraci. Tedy pro vyšší koncentrace dochází k exponenciálně nižší transmitanci. Například měřené hodnoty pro jamku D6 lze vidět na obr. 32.

Navrhované řešení spočívá ve stanovení korekčních faktorů proměnlivých jak pro každou jamku, tak i v rámci jedné jamky. Protože máme k dispozici několik kalibračních snímků pro různé koncentrace, lze pro všechny sestavit jejich vlastní matice korekčních faktorů. Pro danou jamku pak můžeme zjistit závislost velikosti korekčního faktoru na změřené hodnotě jasu v jamce.

```
for a = 1:8
    for b = 1:12
        yyy = reshape(korekcni_faktory(a,b,:), pocet_snimku, 1);
        xxx = reshape(jamky_hodnoty(a,b,:), pocet_snimku, 1);
        pom{a,b} = fit(xxx(:), yyy(:), 'exp1');
        korekcni_funkce{a,b} = coeffvalues(pom{a,b});
    end
end
```

K tomu poslouží funkce *fit()* s argumentem ‚exp1‘, hledáme tedy exponenciální funkci. Lze zvolit i variantu s argumentem ‚exp2‘ pro součet dvou exponenciálních funkcí. Tato varianta byla ponechána v komentářích kódu. Funkce *coeffvalues()* pak extrahuje žádané koeficienty exponenciální funkce pro další použití. Získáme tak pole s obsahem exponenciálních koeficientů pro každou jamku. Dalším krokem je vynásobení každé jamky

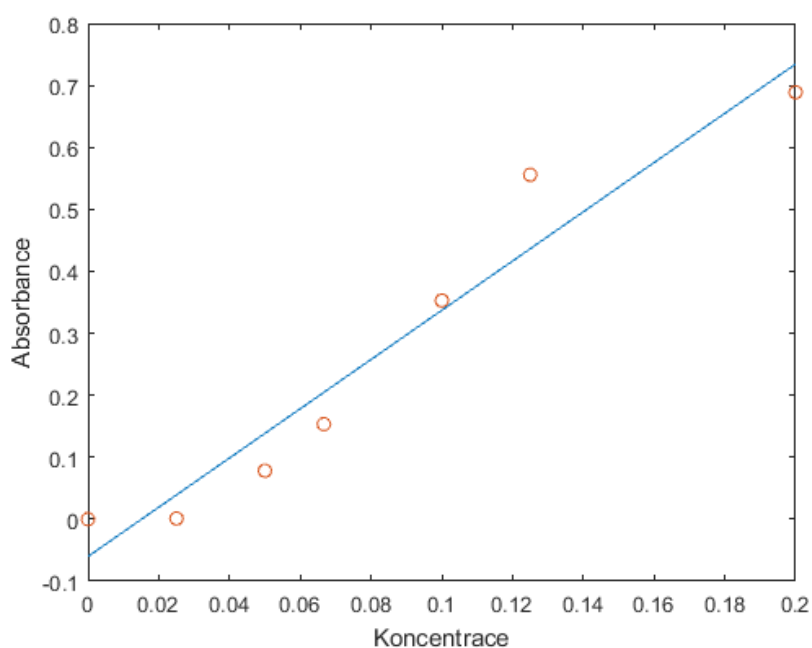
v každé koncentraci odpovídajícím korekčním faktorem, získaným z exponenciální funkce zadané právě oněmi koeficienty. Takto by měly vzniknout ploché hodnoty pro každou koncentraci. Protože jsou však jasové hodnoty i po korekci stále pod vlivem různých negativních jevů (manuální plnění jamek, nepřesné ředění apod.), pravděpodobně nebude dosaženo úplné plochosti hodnot všech jamek. Proto se ještě před výpočtem absorbance destičky při dané koncentraci provede výpočet mediánu všech jamek. Tato hodnota pak vstupuje do klasického výpočtu absorbance s následným stanovením kalibrační křivky funkcí *polyfit()*.



Obrázek 32: Exponenciální závislost jasu na koncentraci v jamce D6

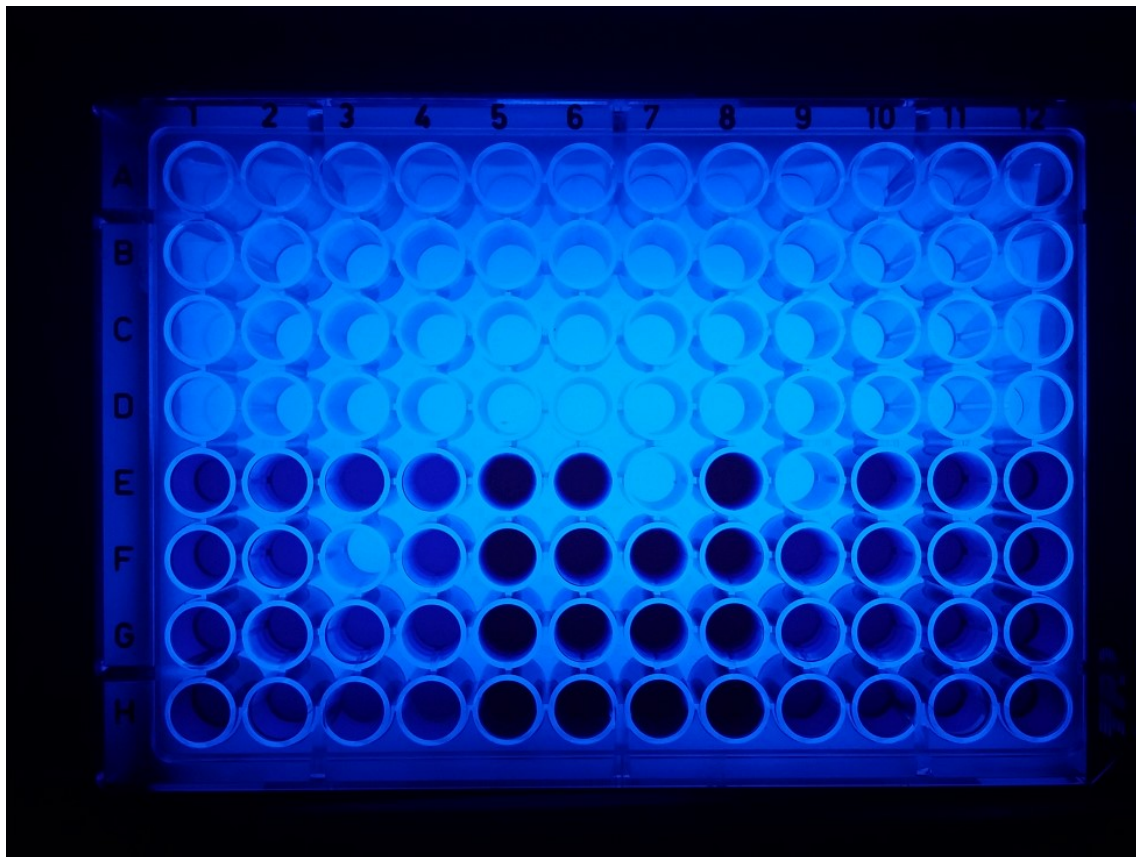
## 4.5 Ověření funkčnosti

Pro otestování algoritmů bylo postupně vyfoceno sedm kalibračních snímků. Destička byla zcela zaplněna destilovanou vodou (blank) a poté roztoky červeného inkoustu v koncentracích 1:40; 1:20; 1:15; 1:10; 1:8; a 1:5 základního roztoku. Byly pořízeny snímky telefonem LG G2 v nastavení ISO 400, rozlišení 3264x2448 (formát 4:3), hodnota korekce expozice 0 a manuální ostření. Ostatní parametry mobilního fotoaparátu nebylo možné ovlivnit. Délka expozice 1/9 s a clonové číslo F2.4. Snímky byly předány autorské kalibrační funkci *shieldcalibr* pro zpracování v obou variantách s metodami All i One. Výsledná kalibrační křivka metody One je vidět na obr. 33.



Obrázek 33: Kalibrační křivka stanovená metodou One s korekčními faktory

Dále byl pořízen snímek, při kterém byla destička zaplněna z necelé poloviny, a to roztoky v koncentracích: vlevo dole – 1:20; uprostřed dole – 1:8; vpravo dole – 1:15. Horní polovina destičky byla ponechána prázdná, stejně tak další tři jamky mezi jamkami se vzorky, viz obr. 34.

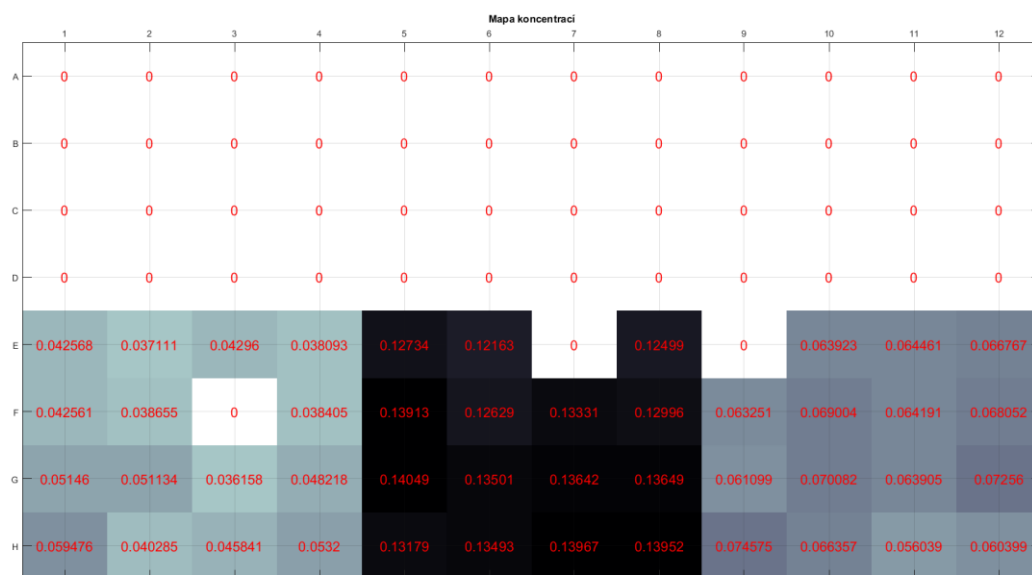


Obrázek 34: Měřený snímek: koncentrace dole zleva doprava - 1:20 | 1:8 | 1:15

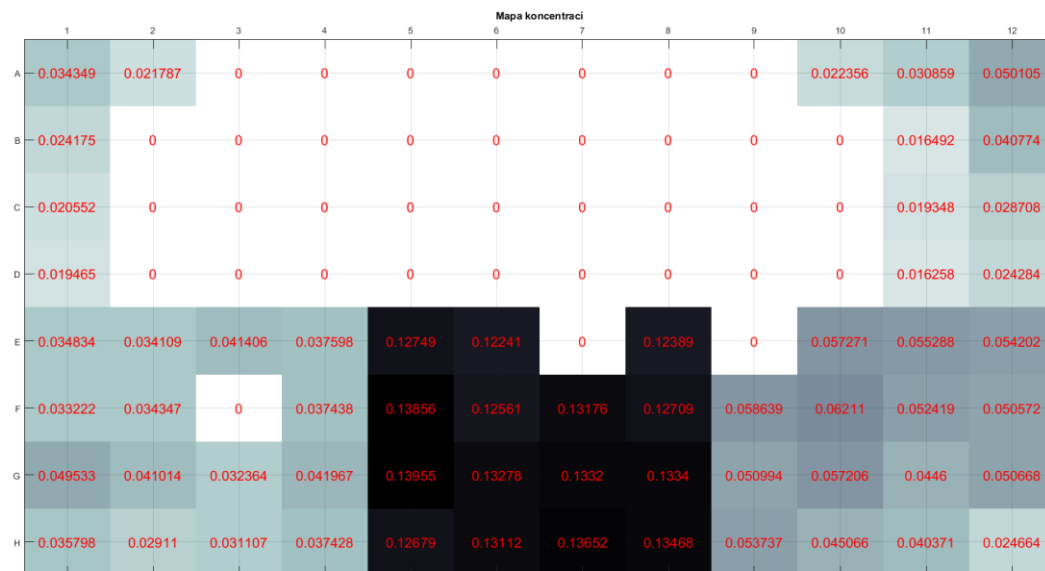
Tento snímek byl spolu s dalšími parametry a proměnnými z kalibrační funkce předložen autorské funkci **shieldmeasure** k měření, také v obou variantách All a One.



Výstupy obou variant lze vidět na obr. 35, 36



Obrázek 35: Mapa koncentrací vzorků na destičce - metoda All

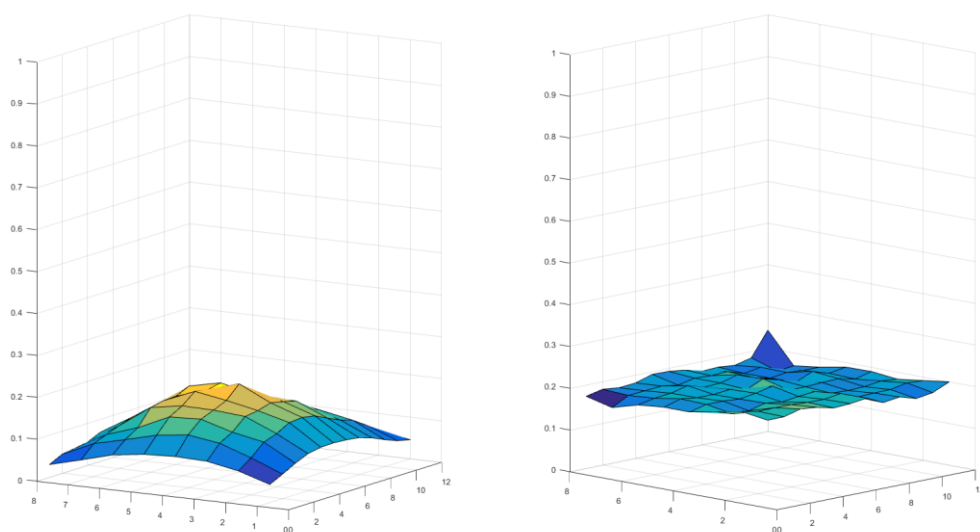


Obrázek 36: Mapa koncentrací vzorků na destičce - metoda One

## 4.6 Diskuze výsledků

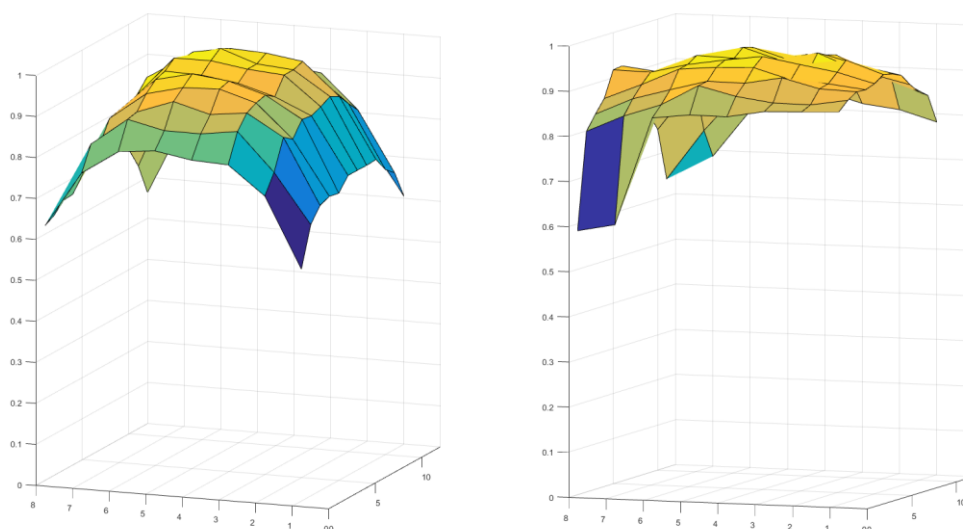
Jak lze vidět na obrázcích obr. 37, 38, algoritmy si se zadaným snímkem poradily celkem obstojně. Kategoricky a řádově jde o poměrně solidní výsledek, za předpokladu, že není vyžadována vysoká přesnost měření. Metoda All je svými výsledky o něco přesnější než metoda One, navíc správně identifikuje prázdné jamky nulovou koncentrací. Metoda One má naopak tendenci přiřazovat koncentraci i prázdným krajním jamkám, neboť jim chybně napočítala určitou kladnou absorbanci.

Může být v této souvislosti zajímavé prozkoumat, jak se podařilo korekčním faktorům vykompenzovat nehomogenitu u kalibračních snímků.



Obrázek 37: Jasové hodnoty v jamkách před a po aplikaci korekčních faktorů při koncentraci 1:5 základního roztoku

Na obrázku obr. 38 lze vidět relativně vysokou úspěšnost v kompenzaci pro vysoké koncentrace. „Želví krunýř“ se mění na jemně vlnitou plochu.



**Obrázek 38: Jasové hodnoty v jamkách před a po aplikaci korekčních faktorů při koncentraci 1:40 základního roztoku**

Aplikace korekčních faktorů na snímky s nízkou koncentrací vzorku sice také vedla ke zvýšení validity hodnot, ovšem ne v takové míře jako u koncentrací vysokých. Protože

Členité vlnění a nedokonalé vyrovnaní jsou příznakem ne zcela odpovídající exponenciální korekční funkce pro dané jamky. Krajiní jamky jsou u nízkých koncentrací i po korekci stále tmavší než zbytek jamek. U prázdných jamek v měřeném snímku se to následně projevilo falešným zvýšením absorbance a tedy i zvýšením koncentrace. Jamkám, ve kterých *shieldmeasure* nevypočítá zápornou nebo nulovou absorbanci, není přidělen status prázdné jamky.

Důvodem pro výpočet ne zcela správných korekčních faktorů je pravděpodobně prokládání bodů křivkou při tvorbě korekční funkce. Pokud předložené body nemají zcela exponenciální závislost, je správnost proložení bodů křivkou negativně ovlivněna. Odhalení příčiny posuvu jednotlivých korekčních faktorů mimo očekávanou exponenciální závislost na jasové hodnotě může být cestou k opravě funkce a nápravě korekčního působení. Problémem je, že tyto posuvy způsobuje hned několik faktorů. Prvním je nepochybně ne zcela správné plnění jamek objemem vzorku. Pokud se objem tekutiny v jamce mezi jednotlivými měřeními liší, nebudou hodnoty jasu a s nimi pak i korekční faktory závislé jen exponenciálně na koncentraci látky ve vzorku, ale také na délce dráhy světla procházející vzorkem. Toto je velmi pravděpodobně důvodem pro slabší výkon korekčních faktorů na krajních jamkách u některých kalibračních snímků, neboť právě krajní jamky jsou kvůli měření, které není kolmé s jejich vertikální osou, k této chybě citlivější než jamky uprostřed destičky.

Dalším důvodem, který se může objevit je ne zcela korektní čtení jasových hodnot z jamek. Protože hledání jamek v obraze pomocí detekce kružnic (Houghova transformace, funkce *imfindcircles()*) není pro tyto účely dostatečně účinné (špatná senzitivita nebo specifita), byl pro určení souřadnic, kde má být čtení hodnot provedeno, zvolen rigidní výpočet pomocí krokování vypočítané vzdálenosti. To však může v případě nedokonalé registrace snímků vést ke čtení nevhodných hodnot, například ze stěny jamky, nebo při nejhorším zcela mimo ni.

Důležitým a v této práci ne zcela prozkoumaným jevem je zasahování mobilního telefonu do snímaných hodnot jednotlivých pixelů v obraze a to i mimo nastavené hodnoty v prostředí fotografické aplikace mobilního telefonu. Bylo experimentálně ověřeno, že oba použité telefony mění expozici v závislosti na míře obsazení jamek vzorky a na útlumu procházejícího světla vzorkem (dle koncentrace). Hodnoty jasů pak prodělávají nelineární posuny. Pokud bylo na jinak prázdnou destičku zaneseno několik tmavých vzorků, došlo k přeexpozici, vysoké hodnoty (světla) byly znatelně zesíleny, i o více než 10 %, naopak nízké hodnoty (tmavá) byly zesíleny jen nepatrně. Tato korekce pravděpodobně také vedla k záporným absorbancím u druhého korekčního snímku – oproti blanku byly totiž stále vysoké hodnoty jasu druhého snímku ještě zesíleny, čímž překonaly hodnoty blanku a světlo bylo tedy zdánlivě zesíleno. Lze tedy předpokládat, že tyto zásahy jsou také z velké části odpovědné za sníženou přesnost prokládání vypočítaných hodnot korekčních faktorů korekčními funkcemi.

Výše zmíněné důvody samozřejmě nepříznivě ovlivňují také přesnost metody All.

## **4.7 Návrhy na vylepšení**

Jedním z cílů této práce je samozřejmě navrhnout další možnosti optimalizace metody. Zde navrhovaná řešení lze v zásadě rozdělit do dvou skupin. První vychází z omezených zdrojů, které byly při této práci k dispozici, kdy při jejich navýšení by nepochybně došlo ke kvalitativnímu posunu v některých oblastech. Tyto návrhy jsou v zásadě opačné k optimalizačním krokům, které byly reálně podniknuty obvykle v zájmu snížení finančních nákladů, zatímco zde předkládané návrhy mají za cíl optimalizovat z hlediska kvality. Druhá skupina je pak založena na nových poznatcích, získaných během řešení této práce a směřujících k obecnému zlepšení metody.

Z první skupiny lze jednoznačně zmínit otázku difuzoru a LED panelů. V případě instalace rozměrově vhodnějších LED panelů (v horším případě více současných typů) by se jistě zjednodušil problém korekce nehomogenity v obrazové analýze. Navrhnout lze zejména rozložení LED, které bude výrazněji přesahovat rozměry mikrotitrační destičky tak, aby byla zajištěna lepší prosvětlenost a tedy i homogenita osvětlení. Zde by se však bylo potřeba smířit s vyššími náklady, možná horší dostupností (zde použité panely bylo v době práce nejsnazší

pořídít) a rozhodně s většími rozměry výsledné konstrukce. Za optimální lze považovat variantu s jednotlivými LED pro každou jamku (případně i s malou baterií LED pro každou jamku). Toto řešení by jistě zajistilo nejlepší dosažitelné parametry osvětlení vzorků. Nevýhodou by pak byla náročnější výroba DPS, kterou by v tomto případě bylo spíš vhodné zařídit u povolanějších osob a vyhnout se tak zdlouhavější domácí výrobě.

Ohledně difuzorů lze nabídnout hned dva způsoby optimalizace. Prvním, jednodušším, je použít také plast HDPE z běžně dostupného obalu, ovšem s vhodnějším tvarem (ideálně úplně plochým). Opravdu plochý difuzor by přispěl ke snížení nehomogenity osvětlení, neboť i jen mírně kroucený difuzor naopak nehomogenitu do měření vnáší. Doplnkem k tomu návrhu budiž jiný materiál než HDPE, ale s podobnými vlastnostmi – např. mléčné PVC. Druhým návrhem je použít úplně jiný druh difuzoru, skutečný difuzor, který je přímo určen k tomuto účelu. Lze navrhnout např. skleněné difuzory pro vědecké účely nebo pevné plastové či skleněné difuzory ze stropního osvětlení. I zde je však nepříznivým faktorem cena takového řešení.

Dále lze navrhnout tisk celého zařízení na 3D tiskárně. Nevýhodou by zde byl převážně potřebný tiskový čas, cenově by však toto řešení vyšlo přibližně stejně. Balsové dřevo, prodávané navíc ve standardizovaných prknech, neposkytuje proti tiskovému materiálu PLA výraznější cenovou výhodu (pokud ovšem není nutné z nějakého důvodu tisk opakovat, především u větších částí). Naopak použitím tisku by bylo docíleno vyšší robustnosti celého zařízení a spolehlivějších rozměrů, než u ručně řezané lehké balsy.

K samotné konstrukci zařízení lze doporučit variantu, u které není celý velký kryt při výměně vzorků snímán, ale zůstává přiklopen a otevírají se jen boční dvířka. Jedná se o jednu z možností, jak zamezit pohybu telefonu usazeného na vrchu velkého krytu a tím snížit náročnost vyhodnocujících algoritmů, které pracují se zarovnáváním jednotlivých snímků.

Určitý návrh lze také vznést směrem k použití Matlabu a aplikace Matlab Mobile. Protože je aplikace v některých ohledech značně omezená, vyžaduje licenci MathWorks, blokuje operace trvající déle než 50 s a často dochází ke kritickým selháním, lze za určitých velmi specifických okolností doporučit přechod na jiné prostředí. Avšak vzhledem k tomu, že je Matlab velmi dobře vybaven pro prováděnou analýzu obrazu a přes uvedené nedostatky je pro tento úkol velmi silným nástrojem, lze toto doporučit opravdu pouze za omezených okolností – vysoké znalosti programování mobilních aplikací (Java, SDK), vlastní server apod. V podmínkách této práce nelze Matlab Mobile považovat za vhodný nástroj, zároveň se však jedná prakticky o jediné řešení, které v sobě nese dostatečnou inovativnost a zároveň umožňuje použít dosud získané znalosti a schopnosti v souvislosti se studovaným oborem.

Za samozřejmé budiž považováno doporučení provést měření na skutečném ELISA měření, pokud je dostupné.

V rámci teoretických návrhů pro metodická zlepšení, lze opět předložit několik návrhů.

Za dobré rozšíření konstrukce lze považovat světlovodná vlákna. Nad každou jamku lze umístit jedno světlovodné vlákno, celý svazek vláken pak ústí pod snímačem telefonu, ten sleduje tmavý prostor mimo samotné vzorky. Na snímač telefonu pak dopadá pouze světlo přicházející z částí jamek skrz světlovody. Jedná se o vlastně o jakési vzorkování vzorků. V obraze by pak byla pozorována pouze matice modrých teček, čímž by se výrazně usnadnila detekce vzorků a potlačení změn v obraze při snímání.

Ze softwarového hlediska se optimalizace také uplatní v několika bodech. Zcela jednoznačně lze doporučit export fotografií z telefonu v příslušném RAW formátu. Tímto se lze vyhnout dodatečným úpravám obrazu, které telefon se snímkem provádí mimo vůli uživatele (např. vyvážení bílé barvy, komprese do JPEG apod.). Bohužel není dnes stále mezi telefony podpora práce s RAW běžná, jako další nevýhodu je nutno připočítat znatelnou velikost souboru. Pro LG G2 byla nalezena jedna fotografická aplikace, deklarující podporu práce s RAW, po instalaci však nebyla funkční, pravděpodobně z důvodů nekompatibility s danou verzí OS Android.

Dále lze uvažovat nad vylepšením detekce jamek na destičce. Klasická funkce `imfindcircles()`, prováděná nad celým snímkem nepodala kvalitní výsledky. Nicméně lze se domnívat, že po rozměření destičky pomocí hran a rohů by bylo možné implementovat klouzavé okno, procházející postupně destičku po daných krocích. Detekce pomocí zmíněné funkce by pak probíhala pouze v mezích daných oknem. Tímto způsobem by mohlo dojít ke zvýšení specifiity.

Zajímavá je teoretická úvaha, zda by bylo možné uplatnit podobné algoritmy, jako zde prezentované, pro fotografování vzorků a vyhodnocování měření bez potřeby komplexního zařízení, nýbrž na otevřeném světle bez podpory dalších systémů. Dle mínění autora lze důvodně předpokládat možnost takového přenosu metody s použitím části zde prezentovaných řešení, a to za předpokladu rozumného přístupu k osvětlení a okolnímu světlu, homogenního a reprodukovatelného podkladu, korekce na světelné podmínky a kalibrace na základě koncentračních standardů.

## 5 Závěr

První část práce zaměřené využití mobilních telefonů k analýze tekutých vzorků se věnuje provedené literární rešerši, poskytující základní náhled na využití mobilních telefonů v biomedicině, novou a dynamicky rozvíjející se větev oboru. Protože se jedná o relativně nové prostředí, většina zdrojů je tvořena především pracemi univerzitních týmů, publikovanými v odborných časopisech a předkládajícími řešení inovativní nebo demonstrativní. Jak už bylo zmíněno v úvodu, provést rešerši všech uveřejněných prací by bylo mimo rozsah této práce.

Druhá část práce se věnuje teoretickému návrhu praktické realizace s využitím mobilního telefonu jako součásti malého analytického systému pro měření hladiny kortizolu ve slinách. Navrhovanou metodou analýzy je ELISA na standardní 96jamkové mikrotitrační destičce prostřednictvím chemického kitu. Teoreticky představeny byly dvě konstrukční varianty systému, lišící se především způsobem realizace detektoru a ovládáním celého systému. Obě varianty sdílejí použití 3D tisku, jako efektivního prostředku pro sestavení krycího a nosného pouzdra.

Z teoretických návrhů byl jeden vybrán do praxe. Cílem této části práce bylo návrh uskutečnit, reálně zhodnotit možnosti a schopnosti metody a navrhnout další optimalizaci. Praktická část předkládá funkční realizaci analytického systému, v rámci něhož bylo vytvořeno komplexní řešení, obsahující aktivní hardwarový produkt využívající elektronických prvků, světelného zdroje, optických prvků a 3D tisku pro zajištění vůči vnějšímu světlu uzavřeného měřicího prostředí; a balíček softwarových funkcí pro programové prostředí Matlab ve spojení s mobilní aplikací Matlab Mobile, využívající metody analýzy obrazu, datové a cloudové služby a samotný mobilní telefon jako základní platformu, pro realizaci měření s možností volby mezi dvěma částečně rozdílnými přístupy vyhodnocení.

Analytický systém byl otestován na skutečných fotografických souborech, dosažené výsledky byly kriticky zhodnoceny a doplněny zpětnou vazbou. Dále byl sestaven soubor praktických a teoretických doporučení, vhodných pro budoucí optimalizaci. Vyjádřena byla také myšlenka o možnosti přenosu metody mimo vyrobené aktivní podpůrné zařízení a aplikaci metody za určitých podmínek na otevřeném světě.

Autor v této práci využil kompetence z několika oblastí svého studia a zároveň při práci získal mnoho nových zkušeností a vědomostí.

## Literatura

- [1] ONCESCU, Vlad, Matthew MANCUSO, David ERICKSON, Saurabh MEHTA a David ERICKSON. *Cholesterol testing on a smartphone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc51194d. ISBN 10.1039/C3LC51194D. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC51194D>
- [2] SHEN, Li, Joshua A. HAGEN, Ian PAPAUTSKY, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Point-of-care colorimetric detection with a smartphone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c2lc40741h. ISBN 10.1039/c2lc40741h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40741h>
- [3] ONCESCU, Vlad, Dakota O'DELL, David ERICKSON, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc50431j. ISBN 10.1039/c3lc50431j. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50431j>
- [4] COMINA, Germán, Anke SUSKA, Daniel FILIPPINI, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Autonomous Chemical Sensing Interface for Universal Cell Phone Readout* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1002/anie.201503727. ISBN 10.1002/anie.201503727. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201503727>
- [5] COSKUN, Ahmet F., Richie NAGI, Kayvon SADEGHI, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Albumin testing in urine using a smart-phone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc50785h. ISBN 10.1039/c3lc50785h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50785h>
- [6] KARLEN, Walter. *Mobile point-of-care monitors and diagnostic device design*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2015, xvi, 169 s. Devices, circuits, and systems. ISBN 9781466589292.
- [7] WANG, S., X. ZHAO, et al.. *Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care*. Lab on a Chip [online]. 2011, 11(20): 3411- [cit. 2015-12-27]. DOI: 10.1039/c1lc20479c. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1lc20479c>
- [8] BERG, B., B. CORTAZAR, et al. *Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*. ACS Nano [online]. 2015, 9(8): 7857-7866 [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.1021/acsnano.5b03203. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b03203>



- [9] ARAFAT H., J. CANNING, et al. *Combined “dual” absorption and fluorescence smartphone spectrometers*. Optics Letters [online]. 2015, 40(8): 1737- [cit. 2015-12-31]. DOI: 10.1364/OL.40.001737. ISSN 0146-9592. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-40-8-1737>
- [10] Test ID: SALCT: Cortisol, Saliva. Mayo Clinic: Mayo Medical Laboratories [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/84225>
- [11] Francis, S.J., Walker, R.F., Riad-Fahmy, D., et al. *Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations*. *J of Pediatrics*, 1987, 129-33.
- [12] Vining, R.F., McGinley, R.A., Maksvytis, J.J., Ho, K.Y. *Salivary cortisol: A better measure of adrenal cortical function than serum cortisol*. *Ann Clin Biochem*, 1983, 329-35.
- [13] LEDVINA, MIROSLAV. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 8024614162.
- [14] *Colorimetry*. Encyclopædia Britannica [online]. [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/colorimetry>
- [15] NAVRUZ, Isa, Ahmet F. COSKUN, et al. *Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array*. Lab on a Chip [online]. 2013, [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1039/c3lc50589h. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50589h>
- [16] *ELISA plate reader*. Enzo Life Sciences [online]. [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/mobile-application/elisa-plate-reader/>
- [17] QINGSHAN WEI, HANGFEI QI, ET AL. *Fluorescent Imaging of Single Nanoparticles and Viruses on a Smart Phone*. ACS Nano [online]. 2013 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1021/nn4037706. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn4037706>
- [18] HOSSAIN, Arafat, John CANNING, et al. *Lab-in-a-Phone: Smartphone-Based Portable Fluorometer for pH Measurements of Environmental Water*. IEEE Sensors Journal [online]. 2015, [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1109/JSEN.2014.2361651. ISSN 1530-437x. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6916991>
- [19] Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. Praha: 1. lékařská fakulta UK. 2009, [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>

[20] LEE, Seoho, Vlad ONCESCU, Matt MANCUSO, Saurabh MEHTA a David ERICKSON. *A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc51375k. ISBN 10.1039/C3LC51375K. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC51375K>

[21] VEJRAŽKA, Martin. *Optické metody používané v biochemii* [online]. Praha. ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE 1. LF UK, 2008 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <https://el.lf1.cuni.cz/p90c9dnejag/>

[22] *Imunoreakce se značenými protilátkami* [online]. Praha: Ústav imunologie, 2. LF UK [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: [http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf)

[23] *Ebola Virus Disease: Diagnosis*. Centers for Disease Control and Prevention [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/diagnosis/>

## Seznam zkratek, symbolů

CCD –	charge-coupled device
CMOS -	Complementary Metal–Oxide–Semiconductor
DPS –	Deska Plošných Spojů
ELISA –	enzyme-linked immunosorbent assay
FWHF –	Full Width at Half Maximum
HSL/V –	barevné prostory Hue, Saturation, Lightness / Value
I/O –	input/output
LED –	Light-Emitting Diode
OS –	Operační Systém
RGB –	barevný prostor Red,Green,Blue
ROI –	Region Of Interest
SNR –	signal-to-noise ratio
URL -	Uniform Resource Locator

## Seznam Příloh

Specifikace mikrotitrační destičky: ANSI\_SLAS\_1-2004\_FootprintDimensions1.pdf

Specifikace LED 8x8 matrix: KWM-50881XBB.pdf

3D model zařízení: cell phone box 2 demonstrace

Skripty a funkce: shieldmeasure.m

shieldcalibr.m

homogenita.m

hrany.m